

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I

PROF. DR. M. MÜLLER-SCHILLING

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EINFLUSS DES NEURONALEN STRESS-SYSTEMS BEI ARTHRITIS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Humanmedizin

der

Medizinischen Fakultät

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Anja Hahnel

2012



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I

PROF. DR. M. MÜLLER-SCHILLING

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EINFLUSS DES NEURONALEN STRESS-SYSTEMS BEI ARTHRITIS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Humanmedizin

der

Medizinischen Fakultät

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Anja Hahnel

2012

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer H. Straub

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Grifka

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2012

# **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung
2. Literaturübersicht
  - 2.1 Genese und assoziierte Immunphänomene der rheumatoiden Arthritis
  - 2.2 Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis
    - 2.2.1 Histopathologisches Entzündungsgeschehen
    - 2.2.2 Veränderte neuroendokrine Immunmodulation
    - 2.2.3 Stress als Einflussgröße auf die Immunmodulation
  - 2.3 Gegenstand der Arbeit
3. Material und Methoden
  - 3.1 Auswahl und Vorbereitung der Tiere
    - 3.1.1 Vorbereitung der DA Ratten
    - 3.1.2 Vorbereitung der Mäuse
    - 3.1.3 Vorbereitung der Wistarratten
  - 3.2 Beurteilung der Entzündung
    - 3.2.1 Ermittlung des klinischen Scores
    - 3.2.2 Vorbereitung des Gewebes
    - 3.2.3 Bestimmung des histologischen Scores
  - 3.3 Immunhistochemie
    - 3.3.1 Prinzip der Immunhistochemie
    - 3.3.2 Tyrosin-Hydroxylase-Färbung

- 3.3.3 Substanz P-Färbung
- 3.3.4 Färbung der immunkompetenten Zellen im Lymphknoten
- 3.3.5 Zählung der Nervenfasern
- 3.3.6 Zählung der immunkompetenten Zellen
- 3.4 Statistische Auswertung und Präsentation der Ergebnisse
  - 3.4.1 Statistische Auswertung
  - 3.4.2 Boxplots
- 4. Ergebnisse
  - 4.1 Kollagen-II-induzierte Arthritis (DA Ratten)
    - 4.1.1 Klinischer Score
    - 4.1.2 Entzündungshistologie
    - 4.1.3 Sympathische Nervenfasern
    - 4.1.4 Substanz P-positive Nervenfasern
    - 4.1.5 Quotient aus sympathischen und Substanz P-positiven Nervenfasern
  - 4.2 TNF-transgene Mäuse
    - 4.2.1 Entzündungshistologie
    - 4.2.2 Sympathische Nervenfasern
    - 4.2.3 Substanz P-positive Nervenfasern
    - 4.2.4 Quotient aus sympathischen und Substanz P-positiven Nervenfasern
  - 4.3 Psychosozialer Stress bei Kollagen-II-induzierter Arthritis
    - 4.3.1 Makrophagen
    - 4.3.2 B-Lymphozyten

#### 4.3.3 Dendritische Zellen

#### 4.3.4 T-Lymphozyten

### 5. Diskussion

#### 5.1 Kollagen-II-induzierte Arthritis

##### 5.1.1 Klinische und histologische Untersuchungen

##### 5.1.2 Sympathische Nervenfasern

##### 5.1.3 Substanz P-positive Nervenfasern

#### 5.2 TNF-transgene Mäuse

##### 5.2.1 Entzündungshistologie

##### 5.2.2 Sympathische Nervenfasern

##### 5.2.3 Substanz P-positive Nervenfasern

##### 5.2.4 Methoden der Konservierung

#### 5.3 Psychosozialer Stress bei Kollagen-II-induzierter Arthritis

##### 5.3.1 Makrophagen

##### 5.3.2 B-Lymphozyten

##### 5.3.3 Dendritische Zellen

##### 5.3.4 T-Lymphozyten

### 6. Zusammenfassung

### 7. Literaturverzeichnis

### 8. Danksagung

### 9. Lebenslauf

10. Eidesstattliche Erklärung

11. Zugrunde liegende Publikation



## **Abkürzungsverzeichnis**

ACTH	adrenokortikotropes Hormon
Anti-CCPs	anti-cyclic citrullinated peptide antibodies
APC	antigenpräsentierende Zelle
bcl-2	b-cell-lymphoma 2
BDNF	brain derived neurotrophic factor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
COMP	cartilage oligomeric matrix protein
CRH	Kortikotropin-Releasing-Hormon
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DHES	Dehydroepiandrosteronsulfat
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
HLA	humane Lymphozytenantigene
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
MAP	mitogen-activated protein
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrixmetalloproteinase
NA	Noradrenalin
NF-κB	nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
RA	rheumatoide Arthritis
SCID	severe combined immunodeficiency
TH	Tyrosinhydroxylase
TNF	Tumornekrosefaktor
u. U.	unter Umständen
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

# **1 Einleitung**

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist mit einer Prävalenz von einem Prozent die häufigste aller entzündlichen Gelenkerkrankungen.<sup>1</sup> Der Altersgipfel liegt zwischen dem 25. und 50. Lebensjahr, wobei Frauen dreimal häufiger eine RA entwickeln als Männer.<sup>2</sup>

Die RA stellt eine Form einer systemischen Bindegewebserkrankung dar, die zunächst periphere Gelenke symmetrisch befällt und mit einer Synovialitis einhergeht, welche im weiteren Verlauf eine Destruktion der Gelenke bewirkt. Daneben können auch Sehnenscheiden und Schleimbeutel sowie extraartikuläre Strukturen wie Gefäße, seröse Häute oder innere Organe befallen sein. Klinisch ist die Krankheit zu Beginn durch ein unspezifisches Prodromalstadium geprägt; so treten unter anderem rasche Ermüdbarkeit, Gewichtsabnahme, subfebrile Temperaturen und Parästhesien auf. Im weiteren Verlauf zeigen sich Morgensteifigkeit und Schwellung der Gelenke sowie weitere Entzündungszeichen, charakteristischerweise an den Fingergrund-, Fingermittel- und Handgelenken bzw. an den Füßen. Die stetig fortschreitende Entzündung führt schließlich zur Destruktion des bindegewebigen Halteapparates und dem Abbau von Knorpel und Knochen bis hin zum vollständigen Funktionsverlust und Ankylosierung des betroffenen Gelenkes. Die extraartikulären Manifestationen der Krankheit sind vielfältig und reichen über Vaskulitiden an Fingern und Zehen mit nachfolgenden Ulzera und Nekrosen bis hin zu Entzündungen des Perikards, der Pleura und der Glomeruli. Bei Befall innerer Organe verläuft die Erkrankung häufig schwer; an typischen Komplikationen sind unter anderem der Myokardinfarkt, die Herzinsuffizienz, Lungenfibrosen und viele weitere Organschädigungen zu nennen.<sup>3</sup>

Die zahlreichen therapeutischen Erfolge der letzten Jahre, beispielsweise der Einsatz von sogenannten „Biologicals“, verdeutlichen die große Bedeutung der grundlagenorientierten Forschung in diesem Bereich, zumal auch neue Therapiekonzepte bei vielen Patienten nicht den gewünschten Erfolg erzielt haben. Vor allem gilt es, die verschiedenen Einflussgrößen auf die Entstehung und Entwicklung einer RA zu verstehen um daraus langfristig Therapiekonzepte entwickeln zu können, da neben dem großen Leidensdruck, der auf den Betroffenen lastet, die RA auch weitreichende sozialmedizinische Folgen mit sich bringt. So ist bekannt, dass bereits im dritten Jahr nach Krankheitsbeginn 20 % der Betroffenen eine Erwerbsunfähigkeitsberentung erhalten und

dass die durch die Krankheit entstehende Arbeitsunfähigkeit für jeden Patienten bei achtjähriger Krankheitsdauer pro Jahr durchschnittlich circa 2835 Euro kostet.<sup>4</sup>

Diese Arbeit ist Teil eines grundlagenorientierten Forschungsprojektes, das sich vor allem mit der Bedeutung der Interaktion des ZNS mit dem endokrinen System und dem Immunsystem beschäftigt und versucht, darin bestehende Fehlregulationen aufzudecken welche zur Entwicklung und Aufrechterhaltung einer RA beitragen. Langfristiges Ziel dieser grundlagenorientierten Forschung ist es, eventuelle Fehlregulationen beheben zu können, neue therapeutische Angriffspunkte zu entdecken bzw. einen Beitrag zur pathophysiologischen Erklärung der Krankheit zu leisten.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Genese und assoziierte Immunphänomene der RA**

Die Genese der RA scheint multifaktoriell und von verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren abhängig zu sein, wobei die definitiven Auslöser bis dato nicht identifiziert werden konnten.<sup>2</sup> Zu den endogen diskutierten Auslösern gehören u. a. genetische Faktoren. So besteht für 75 % aller RA-Patienten eine Assoziation mit einem bestimmten HLA-Allel, welches das sogenannte „shared epitope“ besitzt. Dabei handelt es sich um eine definierte Aminosäuresequenz auf der DR- $\beta$ -Kette des HLA-Klasse-II-Moleküls.<sup>1</sup> Erst kürzlich konnten noch weitere Risikokonstellationen im MHC-Molekül, welche eine Assoziation mit der RA zeigten, identifiziert werden; diese befinden sich in HLA-Molekülen der Klasse I.<sup>5</sup> Darüber hinaus ist die Konkordanzrate für die Krankheit bei eineiigen Zwillingen um ein zehnfaches höher als bei zweieiigen Zwillingen.<sup>1+3</sup> Ein weiterer häufiger Befund bei Patienten mit RA sind hohe Serumantikörpertiter gegen citrullinierte Antigene (Anti-CCPs). Der Nachweis dieser gilt inzwischen als ein sehr spezifisches Kriterium bei der Diagnose einer RA, zumal gezeigt werden konnte, dass das Vorkommen der sog. Anti-CCPs mit einer äußerst massiven Gelenkzerstörung und mit schwerwiegenden extraartikulären Manifestationen assoziiert ist.<sup>6+7</sup> Diese Antikörper wurden auch in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen und zeigten dabei eine Assoziation mit dem HLA-DRB1-Komplex.<sup>8</sup> Zusätzlich konnten neben den Anti-CCPs und dem bereits länger bekannten Rheumafaktor - ein Antikörper, der gegen den F<sub>c</sub>-Teil von IgG-Molekülen gerichtet ist - weitere mit der Entwicklung der RA assoziierte Autoantikörper identifiziert werden.<sup>9</sup> Als exogene Auslöser stehen unter anderem Mikroorganismen wie Viren (vor allem das Epstein-Barr-Virus) und Bakterien wie Mykoplasmen und Mykobakterien in der Diskussion, zumal festgestellt werden konnte, dass das oben erwähnte „shared epitope“ Ähnlichkeit mit viralen Proteinen besitzt.<sup>3</sup>

## 2.2 Pathomechanismen der rheumatoiden Arthritis

### 2.2.1 Histopathologisches Entzündungsgeschehen im Gelenk

In den letzten Jahrzehnten wurden bedeutende Fortschritte in der Analyse der der RA zu Grunde liegenden Pathomechanismen, die dann letztendlich zur Aufrechterhaltung der Gelenkdestruktion führen, gemacht. Verantwortlich für die Destruktion der Gelenke ist die synoviale Hyperplasie,<sup>1</sup> bei der es zu zahlreichen histologischen Veränderungen der Gelenkschleimhaut kommt. Typische histopathologische Veränderungen umfassen dabei unter anderem die Proliferation der synovialen Deckzellschicht sowie die diffuse Infiltration des synovialen Stromas mit Lymphozyten. T-Lymphozyten, Plasmazellen und Lymphfollikel spielen bei der Entstehung von Granulationsgewebe bzw. der Fibrosierung und der vermehrten Vaskularisierung des periartikulären Gewebes eine entscheidende Rolle.<sup>10+11</sup> Die letzte Phase besteht in der Bildung des sogenannten Pannusgewebes, welches auf den Gelenkinnenraum, Knorpel und Knochen vorwächst und eine nachhaltige Zerstörung bewirkt.

Die synoviale Deckzellschicht („lining layer“) besteht beim Gesunden aus ein bis zwei Zellschichten, die von Synoviozyten gebildet werden. Man unterscheidet Typ A-Synoviozyten, welche makrophagenähnliche Funktionen erfüllen, und Typ B-Synoviozyten, welche die Aufgaben von Fibroblasten übernehmen und für die Produktion der Synovialflüssigkeit sowie für die Bildung von Kollagenfibrillen zuständig sind. Unter der synovialen Deckzellschicht befindet sich die Subintima („sublining“), welche reich an Blut- und Lymphgefäßen, Fettzellen und vegetativen Fasern ist.<sup>12+13</sup> Die RA geht mit starken anatomischen Veränderungen der Synovialmembran einher, so zum Beispiel mit einer Verdickung der synovialen Deckzellschicht,<sup>14</sup> welche unter anderem durch das Einwandern von Makrophagen bedingt ist.<sup>15</sup> Einen weiteren Beitrag liefert die erhöhte Proliferationsrate synovialer Fibroblasten,<sup>16</sup> die durch eine vermehrte Expression verschiedener Wachstumsfaktoren (z.B. „basic fibroblast growth factor“<sup>17</sup>) bedingt ist.<sup>18</sup> Weiterhin unterliegen die B-Synoviozyten einer im Vergleich zum Gesunden verminderten Apoptoserate,<sup>19+20+21</sup> welche einen beträchtlichen Beitrag zur synovialen Hyperplasie liefert und unter anderem auf eine verminderte Empfindlichkeit der synovialen Fibroblasten auf verschiedene Wege der Apoptoseinduktion zurückzuführen ist.<sup>22</sup> Die Arbeitsgruppe von Perlman und Mitar-

beitern konnte an Hand einer Modellarthritis zeigen, dass der intrinsische Weg zur Apoptoseinduktion durch eine vermehrte Expression von Molekülen der Bcl-2-Familie (z.B. Mcl-1<sup>23</sup>) gestört zu sein scheint und dies positiv mit der Verbreiterung des „lining layer“ korreliert.<sup>21</sup> Darüber hinaus besitzen auch im Rahmen der Entzündung gebildete Zytokine wie TNF und IL-1 eine antiapoptotische Wirkung; ebenso ist der extrinsische Weg der Apoptoseinduktion über Rezeptoren wie Fas oder den TNF-Rezeptor in RA-Fibroblasten gestört.<sup>24+25</sup>

Die aktivierten Fibroblasten scheinen die wichtigste Rolle in der Knochen- und Knorpeldestruktion bei der RA zu spielen; dabei zeichnen sie sich durch ein äußerst aggressives und invasives Wachstumsverhalten aus, wobei ihre Aktivität zum Teil entkoppelt von immunmodulierenden Prozessen abläuft. In diesem Zusammenhang konnte am SCID-mouse-Model gezeigt werden, dass synoviale Fibroblasten, welche aus der Gelenkschleimhaut von RA-Patienten isoliert wurden, auch in Abwesenheit von humanen Immunzellen ihren gewebezerstörenden Charakter beibehalten.<sup>26</sup> Dieser beinhaltet unter anderem die Synthese gewebeabbauender Enzyme (z.B. die Kathepsine B, K und L),<sup>27</sup> welche beim Gesunden nicht nachgewiesen werden konnten.<sup>26</sup> Auch konnte eine Expression von Matrixmetalloproteinasen (z.B. MMP-1, MMP-3 und MMP-13)<sup>28</sup> sowie von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren belegt werden; diese tragen unter anderem durch das konsekutive Einwandern von T- und B-Zellen zur Unterhaltung des Entzündungsgeschehens bei.<sup>29+30</sup>

Das knorpeldestruierende Verhalten der RA-Synoviozyten wird durch ihre Fähigkeit, an verschiedene Knorpelbestandteile wie Fibronectin, Typ IV-Kollagen und COMP zu binden, bestimmt;<sup>31</sup> diese Eigenschaften werden über die vermehrte Expression von alpha 5/beta 3-Integrin-Rezeptoren vermittelt.<sup>32</sup> Dies konnte durch die Arbeit von Torsten Lowin bestätigt werden, indem gezeigt wurde, dass es bei rheumatoider Arthritis zu einer Aufregulierung von alpha 5- und beta 1-Integrinen kommt.<sup>33</sup> Darüber hinaus scheinen RA-Synoviozyten durch die Produktion von TNF und T-Lymphozyten über den Rank-Ligand eine erhöhte Osteoklastenaktivität zu bewirken, welche zusätzlich zur Knochendestruktion beiträgt.<sup>34</sup> So konnte an einer TNF-transgenen Mausmutante, welche keine Osteoklasten hervorbringt, gezeigt werden, dass bei dieser keine Knochenerosion auftrat, wohingegen andere klinische und histologische Kriterien einer RA simultan zur Kontrollgruppe imponierten.<sup>35</sup>

Die Veränderungen der Subintima sind vor allem durch die Einwanderung von entzündungsunterhaltenden Immunzellen, T- und B-Lymphozyten,<sup>36+37</sup> die Ausbildung von Lymphfollikeln und einer vermehrten Vaskularisierung geprägt.<sup>38</sup> Das Auftreten von hochendothelialen Venulen in der Subintima trägt zusätzlich zur Einwanderung von Immunzellen wie Makrophagen bei.<sup>39</sup> Diese sind neben den aktivierten synovialen Fibroblasten für den Knorpel- und Knochenabbau verantwortlich. In diesem Zusammenhang konnten Mulherin und Mitarbeiter zeigen, dass die Anzahl der im Pannus vorkommenden Makrophagen positiv mit der Gelenkdestruktion korreliert.<sup>40</sup>

Für die massive Infiltration des Synoviums mit Immunzellen verschiedenster Art und für die Unterhaltung der Entzündung werden Zytokine und Interleukine verantwortlich gemacht. So konnte durch die Arbeitsgruppe von Steffen Gay gezeigt werden, dass IL-16 für die Infiltration des Gewebes mit CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten verantwortlich ist.<sup>41</sup> Eine besondere Bedeutung hinsichtlich der Initiation und Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses kommt den Interleukinen IL-1 und IL-6 sowie dem zytotoxischen Tumornekrosefaktor (TNF) zu. IL-1 spielt bereits zu Beginn der Entwicklung einer RA eine entscheidende Rolle. Der Entzündungsprozess beginnt mit der Infiltration von aktivierten T-Lymphozyten in das Synovialgewebe, was zur Freisetzung von IL-1 aus Monozyten, Makrophagen und synovialen Fibroblasten führt. Dies hat wiederum über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B oder der MAP-Kinasen die Freisetzung von IL-6, IL-8 und MMP-1 zur Folge.<sup>42+43</sup> Weiterhin wird TNF freigesetzt.<sup>1</sup> Die Aktivierung der Cyclooxygenase 2 bedingt die Bildung proinflammatorischer Prostaglandine;<sup>44</sup> darüber hinaus kommt es zur Synthese von chondro- und osteolytischen Matrixmetalloproteinasen, deren Inhibitoren ebenfalls durch IL-1 und TNF gehemmt werden. Zusätzlich führen die chemotaktischen Funktionen der Interleukine zur weiteren Infiltration des Gewebes mit Immunzellen. TNF bewirkt die Bildung weiterer proinflammatorischer Zytokine, die Expression gewebeabbauender Enzyme in Endothel- und Synovialzellen sowie die verstärkte Synthese von Adhäsionsmolekülen.<sup>1</sup> Ein weiterer Effekt von TNF ist die Hemmung der Synthese von Proteoglykanen und Kollagen durch Chondrozyten, was zur Gelenkdestruktion beiträgt.<sup>45+46</sup> Keffer und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Mäuse, die Träger des Gens für den humanen TNF sind, eine chronische Polyarthrititis entwickeln. Damit konnten sie ein neues Verfahren zur Entwicklung einer Modellarthrititis etablieren, bei welchem eine Dysbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren simuliert wird wie

sie für die RA beim Menschen ebenfalls angenommen wird.<sup>47</sup> TNF spielt damit eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der RA, zumal nachgewiesen werden konnte, dass sich bei den Mäusen, welche einer anti-TNF-Behandlung unterzogen wurden, keine Arthritis entwickelte.<sup>47</sup> Diese Ergebnisse wurden auch von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, indem bei Mäusen mit einer durch Kollagen II-induzierten Modellarthritis, welche einer anti-TNF-Behandlung unterzogen wurden, sowohl die klinischen Symptome (Schwellung, Rötung, Gelenkschönung) als auch der histologische Arthritisgrad gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert werden konnten.<sup>48</sup> Neutralisierende Prinzipien gegen TNF wie Infliximab werden bereits in der Behandlung der RA beim Menschen eingesetzt.

### 2.2.2 Neuroendokrine Immunmodulation bei rheumatoider Arthritis

Bis dato konnten keine einzelnen Trigger für die Entstehung der RA verantwortlich gemacht werden. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob die fulminante Entzündungsreaktion durch eine permanente Aktivierung des Immunsystems durch ein Agens und/oder durch ein Fehlen bzw. einen Funktionsverlust inhibierender Faktoren bedingt ist. Seit einigen Jahren beschäftigt sich die Disziplin der Neuroendokrinoimmunologie mit der komplexen Regulation des Immunsystems durch endokrine und zentralnervöse Stimuli. So konnte belegt werden, dass verschiedene zirkulierende Zytokine, die während einer spezifischen Immunantwort auf ein bestimmtes Agens gebildet werden, fähig sind, die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPN-Achse) zu aktivieren. Für IL-1 konnte als erstes Zytokin gezeigt werden, dass in direkter Folge eines Anstiegs von IL-1 die Konzentration von Glukokortikoidhormonen im Blut zunimmt.<sup>49</sup> Glukokortikoide wie Kortisol haben über verschiedene Signalwege einen antiinflammatorischen Effekt; sie inhibieren Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und das „activator protein-1“, welche für die Regulation der Synthese von proinflammatorischen Zytokinen zuständig sind (z.B. IL-2).<sup>50+51</sup> Weiterhin hemmen sie auch die Antigenpräsentation.<sup>49</sup> Durch die Aktivierung der HPN-Achse und damit einhergehender ACTH (Adrenokortikotropes Hormon)-Exkretion kommt es zudem zu einer kurzfristig erhöhten Ausschüttung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) in der Nebenniere - ein Hormon, welches ebenfalls antiinflammatorische Effekte ausübt.<sup>52+53</sup>



Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bei der Regulation der Immunantwort ein feedback-Mechanismus vorliegt. Dieser verhindert eine überschießende Reaktion des Immunsystems durch die Aktivierung der HPN-Achse und der damit verbundenen Glukokortikoidproduktion, welche die unbegrenzte Expansion von Immunzellen und Zytokinexpression vermeidet; damit wird die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verhindert.<sup>54</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass neben der HPN-Achse noch ein weiteres immunoregulatorisches System existiert, welches von der Achse zwischen dem Hypothalamus und dem autonomen Nervensystem (HANS-Achse) gebildet wird. Verschiedene Forschungsergebnisse führten zu dem Schluss, dass das sympathische Nervensystem eine bedeutende Rolle in der Regulation des Immunsystems spielt. In diesem Zusammenhang konnten Williams und Felten beweisen, dass Thymus und Milz bei Mäusen von noradrenergen Nervenfasern innerviert werden.<sup>55</sup> Wenig später wurde dies auch für Lymphknoten nachgewiesen, in welchen sympathische Nervenfasern entlang von Gefäßen und im Parenchym auftraten.<sup>56</sup> Im Tiermodell wurde festgestellt, dass die neuronale Aktivität in hypothalamischen Nervenkerne während einer Immunantwort gesteigert ist, wodurch der Nachweis erbracht wurde, dass eine Kommunikation zwischen dem ZNS bzw. dem Hypothalamus und dem Immunsystem stattfinden kann.<sup>57</sup> Weiterhin konnten Sanders und Munson beweisen, dass Noradrenalin über den  $\beta$ -Adrenozeptor einen fördernden Effekt auf die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion ausübt.<sup>58</sup> Die Ausschüttung von Katecholaminen wie Noradrenalin, dem bedeutendsten Transmitter des sympathischen Nervensystems, führt aber dem gegenüber auch zu einer Unterdrückung der Reifung von T-Lymphozyten im Thymus, was die feinmodulatorische Funktion des autonomen Nervensystems unterstreicht.<sup>59+60</sup> Noradrenalin scheint über den  $\beta_2$ -Adrenozeptor auch für die Differenzierung von naiven  $CD4^+$ -T-Lymphozyten zu TH1- bzw. TH2-Zellen verantwortlich zu sein<sup>61</sup> und induziert ebenfalls über jenen Rezeptor die Apoptose von T-Zellen.<sup>54</sup> Es ist bekannt, dass Noradrenalin und Adenosin in hohen Konzentrationen, wie sie bei einer fulminanten Entzündungsreaktion physiologischerweise vorkommen, über Bindung an den  $\beta$ -Adrenozeptor eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung hervorrufen, die mit antiinflammatorischen Effekten einhergeht.<sup>62</sup> Dazu gehört unter anderem die Inhibition der Phagozytose oder die HLA-Expression auf Immunzellen.<sup>62</sup> Adenosin, ein weiterer sympathischer Neurotransmitter, wirkt über den Adenosin-2-Rezeptor ebenfalls

antiinflammatorisch; darüber hinaus kommt es zur neuronalen Synthese von endogenen Opioiden.<sup>62</sup>

Aus diesen Ergebnissen geht klar hervor, dass das Immunsystem einer komplexen Regulation durch unterschiedliche Faktoren auf lokaler und systemischer Ebene unterliegt. Eine Störung in diesem homöostatischen System kann eine überschießende Reaktion des Immunsystems zur Folge haben; diesem Vorgang wird eine entscheidende Bedeutung für die Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen zugeschrieben.<sup>62</sup> Weiterhin kann für die beiden modulierenden Systeme (die HPN- und die HANS-Achse) ein synergistisch antiinflammatorischer Effekt angenommen werden, zumal Kortisol die Synthese von Adrenalin und Noradrenalin in terminalen Abschnitten von Nervenzellen fördert.<sup>63+64+65</sup> In vivo konnten bei RA-Patienten mit Steroidtherapie und erhaltener sympathischer Innervation des Synoviums im Vergleich zu Patienten ohne Steroidtherapie bei erhaltener synovialer sympathischer Innervation bzw. Patienten, welche zwar unter Steroidtherapie standen, deren synoviale sympathische Innervation aber nicht erhalten war, eine geringere IL-8-Produktion, eine geringere T-Zell- und Makrophagendichte sowie eine allgemein weniger fulminante Entzündung im Synovium beobachtet werden.<sup>65</sup>

Für die Ätiologie und Pathogenese der RA ist nun ein Funktionsverlust der beiden inhibitorischen Systeme entscheidend. So scheint es, dass die Kortisolproduktion in Relation zum Entzündungsgrad - gemessen an die HPN-Achse aktivierenden Zytokinen wie IL-6 - in der chronischen Phase der RA nicht adäquat ansteigt, was wohl auf eine Funktionsstörung der Nebennieren zurückzuführen ist.<sup>62+66+67</sup> So reagierten Patienten mit RA auf ACTH-Gabe nicht mit einem adäquaten Anstieg von Kortisol und DHEAS, was wiederum für einen Funktionsverlust der Nebennieren spricht.<sup>67+68+69</sup> Denkbar ist auch, dass sich Veränderungen auf höherer Ebene abspielen. So konnten Harbuz und Mitarbeiter zeigen, dass die CRH (Kortikotropin-Releasing-Hormon)-Sekretion bei einer akuten Adjuvant-induzierten Arthritis stark ansteigt, während bei einer chronischen Entzündung die CRH-Level auf vergleichsweise niedrigem Niveau rangieren und vor allen Dingen erhöhte Vasopressinkonzentrationen gefunden werden konnten.<sup>70</sup> Es scheint, dass bei einer chronischen Aktivierung des HPN-Systems durch Interleukine die antiinflammatorische Achse nicht adäquat stimuliert wird. Auch die lokale Reaktivierung von physiologisch inaktivem Kortison zu aktivem Kortisol in RA-Synoviozyten ist vermindert. Dieser Effekt

betrifft sowohl endogen gebildete Glukokortikoide als auch synthetische Glukokortikoide, was einen reduzierten therapeutischen Effekt zur Folge haben kann und entscheidend zur fulminanten Entzündungsreaktion in den Gelenken beiträgt.<sup>71</sup>

Auf lokaler endokrinologischer Ebene scheint die durch die chronische Entzündung hervorgerufene permanente Ausschüttung von Interleukinen wie IL-1 und TNF auch auf die Produktion von Geschlechtshormonen Einfluss zu nehmen; dies scheint durch die Hemmung bestimmter Enzymsysteme in den Leydig-Zellen zu geschehen.<sup>72</sup> Die Interleukine führen zu einer simultanen Erhöhung der Östrogenkonzentration in der Peripherie und bewirken somit eine Veränderung des Verhältnisses zwischen Östrogenen und Androgenen,<sup>73</sup> wobei - wie in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten nachgewiesen - Östrogen überwog.<sup>74</sup> Östradiol führt unter anderem zu einer vermehrten IL-1-Produktion in Makrophagen<sup>75</sup> und zu einer erhöhten Sekretion von Matrixmetalloproteasen aus Synoviozyten.<sup>76</sup>

Weiterhin unterliegt auch das periphere Nervensystem, welches über oben beschriebene Wege Einfluss auf das Entzündungsgeschehen nimmt, während dem Krankheitsprozess einer Veränderung. Verschiedene Untersuchungen berichten übereinstimmend, dass die Dichte sympathischer Nervenfasern im Synovialgewebe sowohl im Tierversuch als auch bei RA-Patienten abnimmt<sup>77</sup> und dies mit einem erhöhten Entzündungsindex und erhöhter IL-6 Sekretion einhergeht. In sympathektomierten Ratten, bei welchen eine Arthritis induziert wurde, ließ sich eine Progredienz der lokalen Entzündung beobachten, was für einen „protektiven“ Effekt des sympathischen Nervensystems spricht.<sup>78</sup> Allerdings scheint auch der Zeitpunkt der Sympathektomie einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Entzündung zu nehmen, was auf eine duale Rolle des sympathischen Nervensystems hindeutet.<sup>79</sup> Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Noradrenalinsekretion im Synovium von RA-Patienten bei Verlust der sympathischen Nervenfasern in einem gewissen Rahmen durch Synovialmakrophagen aufrecht erhalten wird, was auf den schwindenden Einfluss des sympathischen Nervensystems auf das Entzündungsgeschehen hinweist.<sup>80</sup> Allerdings ist bekannt, dass NA in niedrigen Konzentrationen über den  $\alpha 2$ -Rezeptor bzw. Adenosin als weiterer Transmitter sympathischer Nervenzellen über den A1-Rezeptor eine proinflammatorische Wirkung entfalten kann, was beispielsweise durch eine Erniedrigung des intrazellulären cAMPs mit einer TNF-Erhöhung einhergeht.<sup>81</sup> Der Nerven-

faserverlust bewirkt das Vorherrschen niedriger Noradrenalin-Konzentrationen und damit ein Vorherrschen proinflammatorischer Effekte.

Überdies wurde beobachtet, dass die Anzahl Substanz P-positiver Nervenfasern im Synovialgewebe zunimmt<sup>80</sup> und dieser Neurotransmitter in erhöhter Konzentration in der Synovialflüssigkeit zu finden ist.<sup>82</sup> Substanz P führt über Freisetzung von Kollagenasen und Prostaglandin E<sub>2</sub> aus Synoviozyten<sup>83</sup> und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B<sup>84</sup> zu einer Aufrechterhaltung der Entzündung. Darüber hinaus wirkt es chemotaktisch auf Monozyten.<sup>85</sup> Die Hemmung dieses Transmitters bewirkt eine Abnahme der Entzündung.<sup>86</sup> Weiterhin sensibilisiert Substanz P afferente Nervenendigungen im Gelenk gegenüber mechanischem Druck und Schmerz und führt wiederum zu einer vermehrten Substanz P-Sekretion aus diesen Nervenendigungen.<sup>87</sup> Für eine andere Klasse von sensiblen Nervenfasern, in welcher Calcitonin-gene related peptide als Transmitter fungiert und welche einen eher antiinflammatorischen Effekt besitzen (z.B. über Inhibition von TNF),<sup>88</sup> konnte für RA-Patienten eine Abnahme dieser Nervenfasern im Synovialgewebe festgestellt werden, was wiederum zu einem Überwiegen der Substanz-P vermittelten Effekte führt.<sup>89</sup>

### 2.2.3 Stress als Einflussgröße auf die Immunmodulation

Stress stellt eine in den letzten Jahren in zunehmendem Maße beachtete Einflussgröße auf die Immunantwort dar. So geht z.B. psychosozialer Stress mit einer Aktivierung der beiden Achsen der Stressantwort einher, nämlich der HPN- und der HANS-Achse. Wie oben dargelegt kommt es bei Autoimmunerkrankungen wie der RA zu Veränderungen dieser Achsen; damit liegt die Vermutung nahe, dass Stress einen Einfluss auf den Verlauf derartiger Erkrankungen nehmen kann.

Unter physiologischen Bedingungen kommt es bei Stress durch die Aktivierung der HPN-Achse und des sympathischen Nervensystems zu einer erhöhten Kortisol- und Katecholaminproduktion,<sup>90</sup> was über oben beschriebene Wege vielfältigen Einfluss auf das Immunsystem nimmt, beispielsweise über die Suppression von Zytokinen oder veränderte Zellproliferation und Antikörperproduktion. So konnte in einer Vielzahl von Untersuchungen gezeigt werden, dass die Behandlung von Leukozyten mit Katecholaminen zu einer verminderten IL-12-Produktion und einer erhöhten IL-10-

Produktion führt und dies wiederum eine Verschiebung der CD4<sup>+</sup>-Zellen zugunsten eines TH2-Profiles bewirkt. Letzteres stellt ein tendenziell antiinflammatorisch wirkendes Immunprofil dar,<sup>91</sup> welches den Organismus so möglicherweise vor einer überschießenden Immunreaktion durch proinflammatorische Zytokine aus TH1-Zellen schützt.<sup>92</sup> Bei Mäusen konnte allerdings festgestellt werden, dass die Verschiebung zu Gunsten eines TH2-Profiles mit einer erhöhten Anfälligkeit des Organismus für bestimmte Infektionskrankheiten und der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen einhergeht.<sup>93</sup> Psychosozialer Stress kann somit in zweierlei Hinsicht einen Risikofaktor für die Entwicklung einer RA darstellen. Menschen mit grundsätzlich erhöhtem Stresslevel scheinen häufiger eine Autoimmunerkrankung zu entwickeln als Menschen mit unauffälligem Stresslevel; weiterhin könnte durch die Dysfunktion der antiinflammatorisch wirkenden Achsen die Aufrechterhaltung der Krankheit durch Stress begünstigt werden.<sup>94</sup>

Psychosoziale Stressoren, welche auf den Verlauf von Autoimmunerkrankungen Einfluss nehmen, können in akute und chronische bzw. in sog. „major life events“ (z.B. der Tod eines nahestehenden Menschen) und „minor life events“ eingeteilt werden. Unter physiologischen Bedingungen führen „major life events“ zu einer Freisetzung großer Mengen an Stresshormonen bzw. Stressmediatoren, wohingegen bei „minor life events“ kurzlebige Stresshormone und -mediatoren sowie insgesamt kleinere Mengen freigesetzt werden.<sup>95</sup> Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit RA „minor stress events“ bzw. ein täglich höheres Stressniveau mit einer Verschlechterung der Krankheitssituation einhergehen.<sup>96+97</sup> Damit scheint chronischer Stress eine Steigerung der Krankheitsaktivität zu bewirken, was wohl als Folge einer auf Dauer inadäquaten HPN-Achsen-Aktivierung und damit - in Relation zum Entzündungsgeschehen - unzureichenden Kortisolproduktion zu sehen ist. Für „major life events“ konnte eine gegenteilige Tendenz festgestellt werden; so führt die akute Freisetzung großer Mengen an Stresshormon zu einer verminderten Entzündungsaktivität.<sup>98</sup> Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Kortisol in hohen und niedrigen Konzentrationen jeweils unterschiedliche Effekte auf das Immunsystem ausübt - vergleichbar der Wirkung von Noradrenalin über unterschiedliche Rezeptoren. Niedrige Kortisolgaben führen beim Menschen so zu einer Erhöhung von IL-6 und TNF.<sup>99</sup> Neben der bei RA-Patienten verminderten Kortisolexkretion ist auch die zirkadiane Rhythmik der Kortisolfreisetzung gestört,<sup>100+95</sup> was eine positive Korrelation mit Zei-

chen der Krankheitsaktivität zeigt.<sup>101</sup> Es konnte nachgewiesen werden, dass bei RA-Patienten auch in Bedarfssituationen (z.B. im Rahmen einer anstehenden Operation) nicht adäquat mit einer Produktion von Stresshormonen reagiert wird, obwohl durch hohe Konzentrationen von IL-1 und IL-6 nachgewiesenerweise die Aktivierung des Immunsystems und damit der HPN-Achse stattfand.<sup>102</sup> In einer anderen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Adrenalin - also die Simulation einer Stresssituation - bei Individuen mit RA zu einem raschen Abfall der Kortisolkonzentration im Blut führt, was bei gesunden Probanden nicht beobachtet werden konnte.<sup>103</sup> Der Defekt scheint in der Nebenniere zu liegen, da in zahlreichen Studien überdurchschnittlich hohe Konzentrationen für ACTH - wohl als Folge eines defizienten Kortisolanstiegs - nachgewiesen werden konnten.<sup>104</sup> Dies legt den Schluss nahe, dass ein inadäquater Anstieg des Serumkortisols, der für die Aufrechterhaltung der Homöostase unabdingbar ist, einen negativen Einfluss auf den Verlauf der RA hat, vor allem wenn davon ausgegangen wird, dass Kortisol in niedrigen Konzentrationen einen aktivierenden Einfluss auf das Immunsystem ausübt. Neben der verminderten Sekretion von Kortisol konnte zudem bei manchen Patienten eine verminderte intrazelluläre Dichte von Glukokortikoidrezeptoren festgestellt werden, wohingegen die Dichte membrangebundener Rezeptoren erhöht war.<sup>105+106</sup> Dies könnte hinweisend auf eine „Kortisolresistenz“ sein, welche im Krankheitsverlauf auftritt.<sup>107</sup>

Die Aktivierung der Stressachsen scheint darüber hinaus einer Gewöhnung ausgesetzt zu sein. Die Ausschüttung von ACTH bzw. Kortisol wird bei Präsentation von Stressoren (z.B. einer Entzündungsinduktion bei Ratten) von Mal zu Mal geringer; letztendlich nähert sie sich der basalen Konzentration an, was wiederum zu einer Exazerbation der Entzündung führt. Die Reaktion auf andersartige Stressoren bleibt dagegen unverändert.<sup>108</sup>

Auch der andere Part des Stresssystems, das sympathische Nervensystem mit seinem Transmitter Noradrenalin, scheint seinen antiinflammatorischen Einfluss zu verlieren. So konnte bei RA-Patienten ein Verlust von  $\beta$ -Adrenorezeptoren auf peripheren Immunzellen festgestellt werden - jener Rezeptor, über welchen NA seine antiinflammatorische Wirkung entfaltet.<sup>109</sup> Weiterhin konnte bei Patienten mit juveniler Polyarthrititis eine Steigerung der Expression von  $\alpha$ 1-Rezeptoren festgestellt werden, was mit einer IL-6 Ausschüttung<sup>109</sup> sowie verminderten Konzentrationen von No-

radrenalin im Gewebe, die durch den Nervenfaserverlust verursacht werden, einhergeht.<sup>80</sup>

## **2.3 Gegenstand der Arbeit**

Alle dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen wurden an Hand einer induzierten Modellarthritis bei Ratten bzw. Mäusen durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zum Einen mit der Entzündungshistologie in befallenen Gelenken und versucht, eine Korrelation zwischen dem histologischen Entzündungsgrad und der zu beobachtenden Klinik herzustellen, um auf diese Weise die Eignung einer Modellarthritis zur Untersuchung pathophysiologischer Vorgänge bei RA aufzuzeigen.

Zum anderen wurde aufgrund der multiplen Einflüsse des peripheren Nervensystems auf den Verlauf von Autoimmunerkrankungen eine quantitative Bestimmung von Substanz P-positiven und sympathischen Nervenfasern lokal am Entzündungsort im Gelenk durchgeführt, um so den tatsächlichen lokalen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen zu untersuchen und eine Korrelation mit dem histologischen Entzündungsgrad zu erstellen.

Weiterhin wurde der potentielle Einfluss von psychosozialem Stress bei RA untersucht, indem am Tiermodell das quantitative Auftreten verschiedener Immunzellen in sekundären Lymphorganen im Vergleich zwischen gestressten und nicht gestressten Tieren ermittelt wurde.

### **3 Material und Methoden**

Den Untersuchungen liegen tierexperimentelle Methoden zu Grunde; sie gliedern sich in drei Teilexperimente.

Zum Einen wurden bei DA Ratten im Verlauf einer Modellarthritis die Anzahl von sympathischen und Substanz P-positiven Nervenfasern in gelenkbenachbarten Geweben sowie die Entzündungshistologie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht. In einem weiteren Experiment wurden die gleichen Untersuchungen bei Mäusen, die Träger des Gens für den humanen TNF sind, im Vergleich mit dem Wildtyp durchgeführt. In einem dritten Teilexperiment wurde bei männlichen Wistarratten, bei welchen ebenfalls eine Modellarthritis ausgelöst wurde und die zusätzlich psychosozialen Stress ausgesetzt waren, die Anzahl immunkompetenter Zellen in Lymphknoten wiederum im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ermittelt.

#### **3.1 Auswahl und Vorbereitung der Tiere**

##### **3.1.1 Vorbereitung der DA Ratten**

Für die Untersuchungen wurden weibliche DA Ratten verwendet. Zu Beginn der Untersuchungen (Tag 0) wurde den Tieren der Versuchsgruppe 300 µg bovines Typ II Kollagen, das in inkomplettem Freund Adjuvant gelöst war, injiziert. Den 30 Tieren der Kontrollgruppe wurde eine 0,9%ige Natriumchlorid-Injektion verabreicht. Die Injektion erfolgte jeweils intradermal in die Schwanzwurzel. An den Tagen 5, 14, 28, 41 und 55 nach Injektion wurden in beiden Gruppen jeweils sechs Tiere durch Enthauptung getötet (siehe Tabelle 3.1).

Sofort nach Tötung der Tiere wurden die Extremitäten abgetrennt, diese in 4%iger Formalinlösung fixiert, in PBS-Puffer gewaschen und in RDO Rapid Decalcifier entkalkifiziert. Nach einer erneuten Waschung der Pfoten in PBS wurden diese für 24 Stunden in 20%iger Saccharose in PBS inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe in einem protektiven Gefriermedium (Tissue Tek, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Holland) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.



Die Versuche mit den DA Ratten wurden in Regensburg durchgeführt.

Tab. 3.1: Anzahl der eingesetzten DA Ratten

	Kontrolltiere	arthritische Tiere
Tag 5	6	5
Tag 14	5	6
Tag 28	4	6
Tag 41	6	6
Tag 55	5	5

Die tatsächlich eingesetzte Anzahl der Tiere weicht von der Planung durch das vorzeitige Versterben einzelner Tiere ab.

### 3.1.2 Vorbereitung der Mäuse

Die sechs Versuchstiere exprimieren den humanen TNF und entwickeln damit circa vier bis sechs Wochen nach ihrer Geburt eine chronisch entzündliche Polyarthrititis. Die Tötung der Tiere durch Enthauptung erfolgte zehn Wochen nach ihrer Geburt. Die Fixierung der Gewebe erfolgte mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Verfahren. Bei jeweils drei Tieren aus der Versuchs- und Kontrollgruppe wurde die Fixierung mittels Perfusion durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden sowohl Formalin zur Fixierung (30 Minuten) als auch RDO zur Dekalzifizierung (drei Stunden) durch das Gefäßsystem der Maus gepumpt. Die anderen sechs Tiere aus der Versuchs- und Kontrollgruppe wurden für jeweils fünf Tage zur Knochendekalzifizierung in einem RDO- und drei Tage zur Fixierung in einem Formalinbad behandelt (siehe Tabelle 3.2). Ziel der unterschiedlichen Behandlungsformen war es zu ermitteln, welches Verfahren für das Gewebe schonender war.

Tab. 3.2: Anzahl der eingesetzten Mäuse

	Perfundiert	nicht perfundiert
Wildtyp	2	3
TNF-transgen	3	3

Die tatsächlich eingesetzte Anzahl der Tiere unterscheidet sich von der Planung durch das vorzeitige Versterben eines Tieres.

### 3.1.3 Vorbereitung der Wistarratten

Für die Untersuchungen wurden männliche Wistarratten (Zucht: Lehrstuhl Tierphysiologie der Universität Bayreuth) verwendet. Die Auslösung der Modellarthritis erfolgte in gleicher Weise wie bei den DA Ratten. Es existierten eine Kontrollgruppe ohne Modellarthritis und zwei Gruppen mit Modellarthritis, wobei eine von letzteren zusätzlich psychosozialen Stress ausgesetzt wurde (siehe Tabelle 3.3). Die Ratten der gestressten Gruppe wurden dazu sieben Tage lang mit adulten Long Evans Ratten (Zucht: Lehrstuhl für Tierphysiologie der Universität Bayreuth) zusammengebracht. Letztere verhalten sich aggressiv gegenüber fremden Artgenossen (Resident-Intruder-Konfrontation)<sup>110</sup>. An Tag 4 der Konfrontation wurde die Arthritis sowohl bei den gestressten als auch bei den nicht gestressten Tieren induziert (Tag der Arthritisinduktion = Tag 0). An den Tagen 4 und 14 erfolgten jeweils die Tötung der Tiere sowie die Entnahme der Lymphknoten. Diese wurden drei Tage in 3,7%igem Formaldehyd fixiert, anschließend in PBS gewaschen und über Nacht in 20%ige Saccharose-Lösung gelegt. Die Lymphknoten wurden in TissueTek eingefroren und bis zur Untersuchung bei -80°C aufbewahrt. Die Tierversuche wurden in Bayreuth (Lehrstuhl für Tierphysiologie der Universität Bayreuth) durchgeführt.

Tab. 3.3: Anzahl der untersuchten Lymphknoten

	Kontrolltiere	Arthritische Tiere	
		Gestresst	nicht gestresst
Tag 4	1	7	10
Tag 14	2	5	4

## 3.2 Beurteilung der Entzündung

### 3.2.1 Ermittlung des klinischen Scores

Vor der Tötung der DA Ratten wurde jede Pfote nach klinischen Arthritiszeichen beurteilt. Konnte durch eine sichtbare Gelenkschwellung die Beteiligung eines Zehengelenks, Mittelfußgelenks oder Sprunggelenks festgestellt werden wurde jeweils ein Punkt vergeben. Wurde die Pfote beim Auftreten geschont bzw. überhaupt nicht mehr benutzt erhielt die Extremität einen zusätzlichen Punkt. Pro Pfote konnten so maximal vier Punkte und beim gesamten Tier 16 Punkte vergeben werden.

### 3.2.2 Vorbereitung des Gewebes zur Bewertung der Entzündungshistologie

Zur histologischen Beurteilung der Entzündung und der Gelenkdestruktion wurden sowohl von den Extremitäten der DA Ratten als auch von den Extremitäten der Mäuse Hämatoxylin-Eosin-Färbungen angefertigt. Dazu wurden jeweils von einer Hinterpfote der Tiere mit einem Gefrierkryotom (Kryotom 2800E Jung Frigocut, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland) 12 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger (SuperFrost Plus Objektträger, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht. Die Anfärbung wurde unter dem Abzug durchgeführt. Nach Antrocknen des Gewebes erfolgte die Färbung der Zellkerne durch ein dreiminütiges Hämalaunbad (Mayers Hämalaunlösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Zur Entfernung des überschüssigen Hämalauns wurden die Schnitte unter fließendem Wasser abgespült

(1 min); anschließend wurden sie zur Anfärbung des Gewebes für 30 s in Eosin (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) getaucht, welches wiederum mit Leitungswasser wenige Sekunden abgespült wurde. Zur Fixierung der Färbung wurden die Schnitte im Anschluss mit einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt. Dazu verweilten sie jeweils für kurze Zeitspannen in 50%igem, 70%igem, 96%igem und 100%igem Alkohol (J.T.Baker, Deventer, Holland). Die endgültige Fixierung der Färbung erfolgte für drei Minuten in Xylol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Als Eindeckelmedium wurde Rothistokitt (Roti Histokitt, Roth, Karlsruhe; Deckgläser: Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Die Schnitte wurden zur Verdampfung des überschüssigen Xylols über Nacht unter dem Abzug belassen.

### 3.2.3 Bestimmung des histologischen Scores

Zur histologischen Beurteilung der Entzündung und Gelenkdestruktion wurden die Gelenke der Hinterpfote hinsichtlich der „Infiltration des Gelenkspaltes“, „Verdickung des Synovialgewebes“ sowie „Knorpel- und Knochendestruktion“ untersucht und Scorewerte (1-4) für die jeweiligen Parameter vergeben. Ein Gelenk konnte so maximal 16 Punkte erhalten. Aus der Summe der Scorewerte der einzelnen Gelenke, jeweils vier pro Tier, wurde der Durchschnittswert der Pfote errechnet.

## 3.3 Immunhistochemie

### 3.3.1 Prinzip der Immunhistochemie

Den im Folgenden beschriebenen Verfahren liegt die Technik der indirekten Immunfluoreszenz zu Grunde. Dabei wird das Gewebe mit einem Antikörper inkubiert, der ein bestimmtes Protein detektiert und daran bindet. Durch die Behandlung des Gewebes mit einem sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und an ein fluoreszierendes Substrat gebunden ist, kann das Protein im Zielgewebe, im vorliegenden Falle Nervenfasern bzw. immunkompetente Zellen, sichtbar gemacht werden (Abb. 3.1).

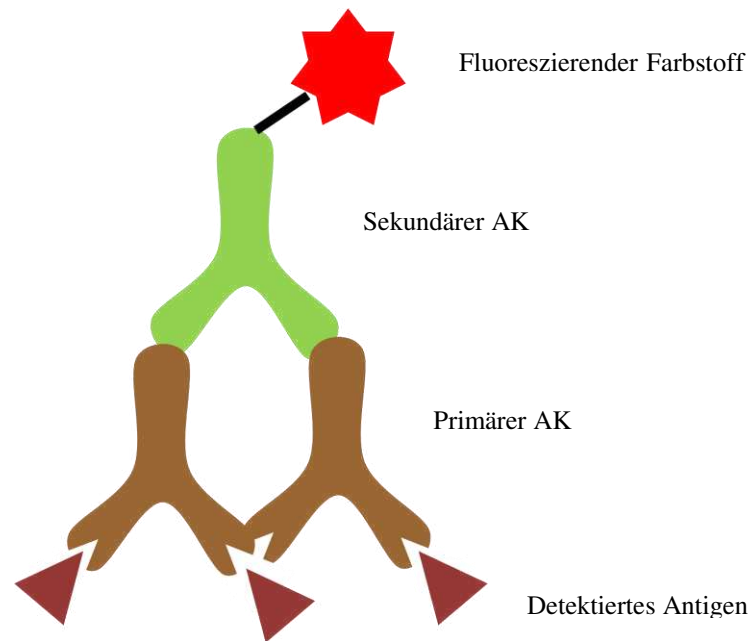


Abb. 3.1: Modell der indirekten Immunfluoreszenz

### 3.3.2 Tyrosin-Hydroxylase (TH)-Färbung

Die Darstellung der sympathischen Nervenfasern erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz. Dazu wurden jeweils von einer Hinterpfote der Tiere mit dem Gefrierkryotom 12 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Nach dem Antrocknen des Gewebes auf den Objektträgern wurden diese für zehn Minuten in PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Fettstift (DakoPen, Dako Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland) umrandet, um ein Verlaufen der aufzutragenden Lösungen zu verhindern. Um eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers zu vermeiden, wurden auf die Schnitte zunächst 100 µl einer Blocklösung aus FCS (fötales Kälberserum, PAN Systems, Aidenbach, Deutschland), BSA (bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) und Ziegenerum (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) aufpipettiert und diese für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte für zehn Minuten in PBS gewaschen. Nun erfolgte die Behandlung mit dem gegen das Enzym Tyrosin-Hydroxylase gerichteten primären Antikörper (Rabbit Anti-Tyrosine-Hydroxylase Affinity Purified Polyclonal Antibody, Chemicon International Inc., Temecula, CA,

USA). Dieser wurde in einem Verhältnis von 1:100 mit einem goat/BSA-Serum-Gemisch, das zuvor in einem Verhältnis von 1:10 angesetzt wurde, verdünnt. Anschließend wurden 150 µl dieser Lösung auf die Schnitte pipettiert. Auf die Kontrollschnitte, die der Überprüfung der spezifischen Bindungsfähigkeit des sekundären Antikörpers dienten, wurde lediglich das goat/BSA-Serum-Gemisch aufgetragen. Die Schnitte wurden anschließend für 12-18 h bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Lösungen von den Schnitten entfernt und für je zweimal fünf Minuten in PBS mit Triton (0,3 %, Triton x-100, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) bzw. fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Kontrollschnitte wurden dabei stets getrennt von den Schnitten, die mit dem Antikörper inkubiert waren, gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 546, goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) wurde nun aufgrund der Lichtempfindlichkeit des fluoreszierenden Farbstoffs im Halbdunkeln in einem Verhältnis von 1:500 mit dem goat/BSA-Serum-Gemisch verdünnt; anschließend wurden 150 µl dieser Lösung auf alle Schnitte einschließlich der Kontrollen aufgebracht. Die Schnitte wurden für 90 Minuten in Dunkelkammern inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung abgeklopft und ein Waschgang für zweimal fünf Minuten in PBS mit Triton (0,3 %) und einmal fünf Minuten in PBS durchgeführt. Das Eindeckeln der Schnitte erfolgte nun im Halbdunkeln mit Hilfe eines Fluoreszenzeindeckelmediums (Fluorescent mounting medium, DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland). Die Schnitte wurden für maximal eine Woche im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

### 3.3.3 Substanz P-Färbung

Zur Sichtbarmachung der Substanz P-positiven Nervenfasern wurde ebenfalls die indirekte Immunfluoreszenz verwendet. Sowohl von den Ratten- als auch den Mäusepfoten wurden mit dem Gefrierkryotom 12 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Objektträger aufgetragen. Nach Antrocknen der Gewebe auf dem Objektträger wurden die Schnitte für zehn Minuten in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden daraufhin mit einem Fettstift umrandet; anschließend erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindestellen mittels einer Lösung aus BSA, Chicken Serum (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland), FCS und PBS. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur für

45 Minuten mit der Blockierlösung inkubiert, anschließend erfolgte ein Waschgang für zehn Minuten in PBS. Nun erfolgte die Behandlung des Gewebes mit dem gegen Substanz P gerichteten primären Antikörper (Substance P goat polyclonal IgG Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Dieser wurde für das Rattengewebe im Verhältnis 1:100, für das Mäusegewebe im Verhältnis 1:200 mit einem Gemisch aus PBS mit Triton (0,3 %) und Rabbit-Serum (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland), das zuvor im Verhältnis 1:10 angesetzt wurde, verdünnt; anschließend wurden auf jeden Schnitt 150 µl dieser Lösung pipettiert. Auf die Kontrollschnitte wurden lediglich 150 µl des PBS mit Triton/Rabbit-Serum-Gemisches aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für 12-18 Stunden bei 4°C im Kühlschrank. Die Schnitte wurden im Anschluss zweimal fünf Minuten in PBS mit Triton (0,3 %) und einmal fünf Minuten in PBS gewaschen. Alle Schnitte - einschließlich der Kontrollschnitte - wurden anschließend im Halbdunklen mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor 546 rabbit anti-goat, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA), der in einem Verhältnis von 1:500 mit dem PBS mit Triton/Rabbit-Serum-Gemisch verdünnt wurde, für 90 Minuten inkubiert. Es folgte ein weiterer dreigängiger Waschgang, danach erfolgte das Eindeckeln mittels Fluoreszenzeindeckelmedium (Fluorescent mounting medium, DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland). Die Schnitte wurden maximal für eine Woche bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.3.4 Färbung der immunkompetenten Zellen im Lymphknoten

Die Anfärbung der immunkompetenten Zellen im Lymphknoten der Wistarratten erfolgte ebenfalls mittels Immunfluoreszenz; die Vorgehensweise war dabei ähnlich wie bei der Anfärbung der Nervenfasern. Die Schnittdicke der Präparate der Lymphknoten betrug 5 µm. Für die Sichtbarmachung der Makrophagen wurde ein Primärantikörper (Verdünnung 1:500) verwendet, der gegen ein membranständiges Glykoprotein der Lysosomenmembran gerichtet ist; dieses wird v.a. von Gewebsmakrophagen exprimiert (mouse anti-rat-Monozyten/Makrophagen MAB 1435, Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA). Für die B-Lymphozyten wurde ein gegen das membranständige CD 45 gerichteter Antikörper (Verdünnung 1:500, mouse anti-rat CD 45 RA, AbDserotec, Raleigh, NC, USA), für die dendritische Zellen ein gegen das

MHC II Molekül gerichteter Antikörper (Verdünnung 1:1000; mouse anti-rat MHC Class II RT1B, AbDserotec, Raleigh, NC, USA) und für die T-Lymphozyten ein gegen den T-Zell-Rezeptor gerichteter Antikörper (Verdünnung 1:500, mouse anti-rat TCR alpha/beta, AbDserotec, Raleigh, NC, USA) eingesetzt. Als Sekundärantikörper fungierte Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA).

### 3.3.5 Zählung der Nervenfasern

Die Anzahl der sympathischen und sensiblen Nervenfasern pro Quadratmillimeter wurde ermittelt, indem mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leitz DMRBE, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) bei 400facher Vergrößerung pro Gelenk in zwölf Gesichtsfeldern die Anzahl der Nervenfasern mit einer Länge von mindestens 50  $\mu\text{m}$  ausgezählt wurden. Pro Pfote wurden mindestens drei Gelenke, jeweils verteilt auf die Zehen, Mittelfuß- und Sprunggelenksregion, berücksichtigt. Die Anzahl der gezählten Nervenfasern wurde mit dem Faktor 3,3 multipliziert woraus die Anzahl pro  $\text{mm}^2$  ermittelt werden konnte.

### 3.3.6 Zählung der immunkompetenten Zellen

Zur Bestimmung der Zellen pro Quadratmillimeter wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop pro Lymphknoten und Tier bei 400facher Vergrößerung 17 Gesichtsfelder nach positiv-gefärbten Zellen ausgezählt. Die Anzahl der gezählten Zellen wurde mit dem Faktor 3,3 multipliziert, woraus die Anzahl pro  $\text{mm}^2$  ermittelt werden konnte.



### 3.4 Statistische Auswertung und Präsentation der Ergebnisse

#### 3.4.1 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 10.0 und SigmaStat 10.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

Die statistischen Berechnung der in den Versuchen gewonnenen Daten erfolgte mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney U-Test. Dieser Rangtest vergleicht die Verteilung zweier unabhängiger Stichproben, die mindestens Ordinalskalenniveau besitzen müssen. Der Mann-Whitney U-Test untersucht, ob ein Unterschied der Mediane vorliegt. Bei einem vorgegebenen Testniveau von 5 % ist bei einem Signifikanzniveau  $\alpha$  von unter 0,05 die Annahme von Unterschieden als akzeptabel anzusehen.

#### 3.4.2 Boxplots

Die graphische Darstellung der Versuchsergebnisse erfolgte mittels Boxplots. Zur Darstellung der einzeln erfassten Werte wurden Scatter plots darüber gelegt (Abb. 3.2).

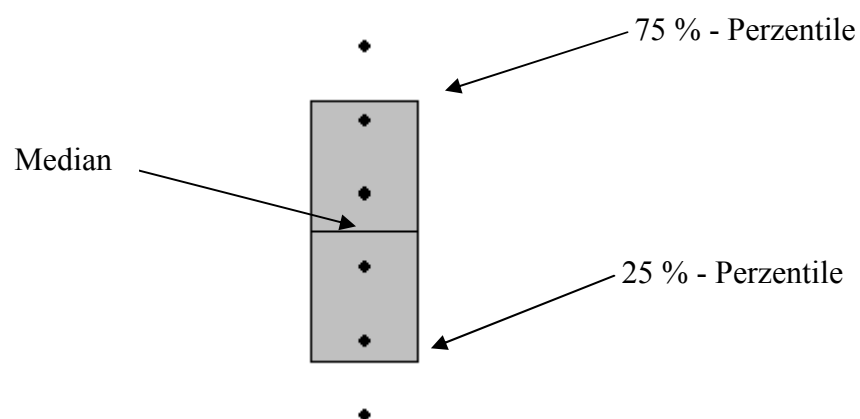


Abb. 3.2: Boxplot mit Scatter plot

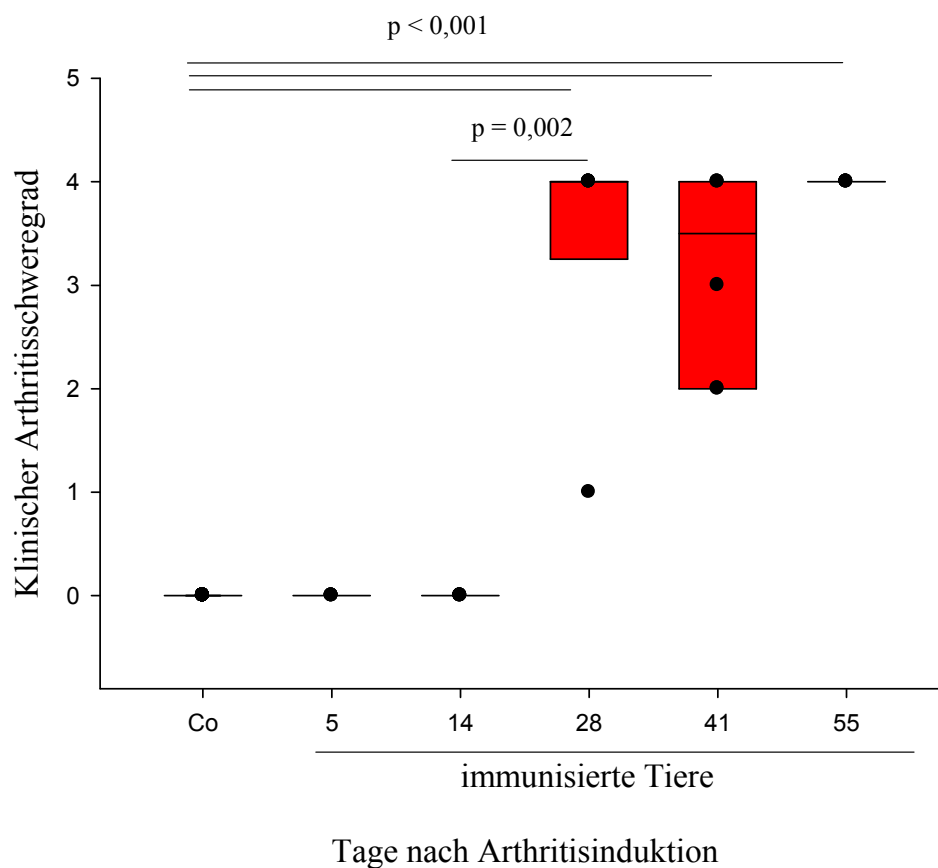
Eine derartige Darstellung der Versuchsergebnisse ermöglicht eine Analyse der Symmetrie einer Verteilung, der Lage der zentralen Tendenz sowie der Variabilität der Werte. Der Median teilt die Verteilung in zwei Hälften: darüber und darunter liegen je 50 % der Daten. Der besondere Vorteil des Median und damit der Darstellung der Versuchsergebnisse mittels Boxplots gegenüber dem arithmetischen Mittel besteht in seiner geringeren Abhängigkeit von Ausreißern.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Kollagen II-induzierte Arthritis (DA-Ratten)**

#### **4.1.1 Klinischer Score**

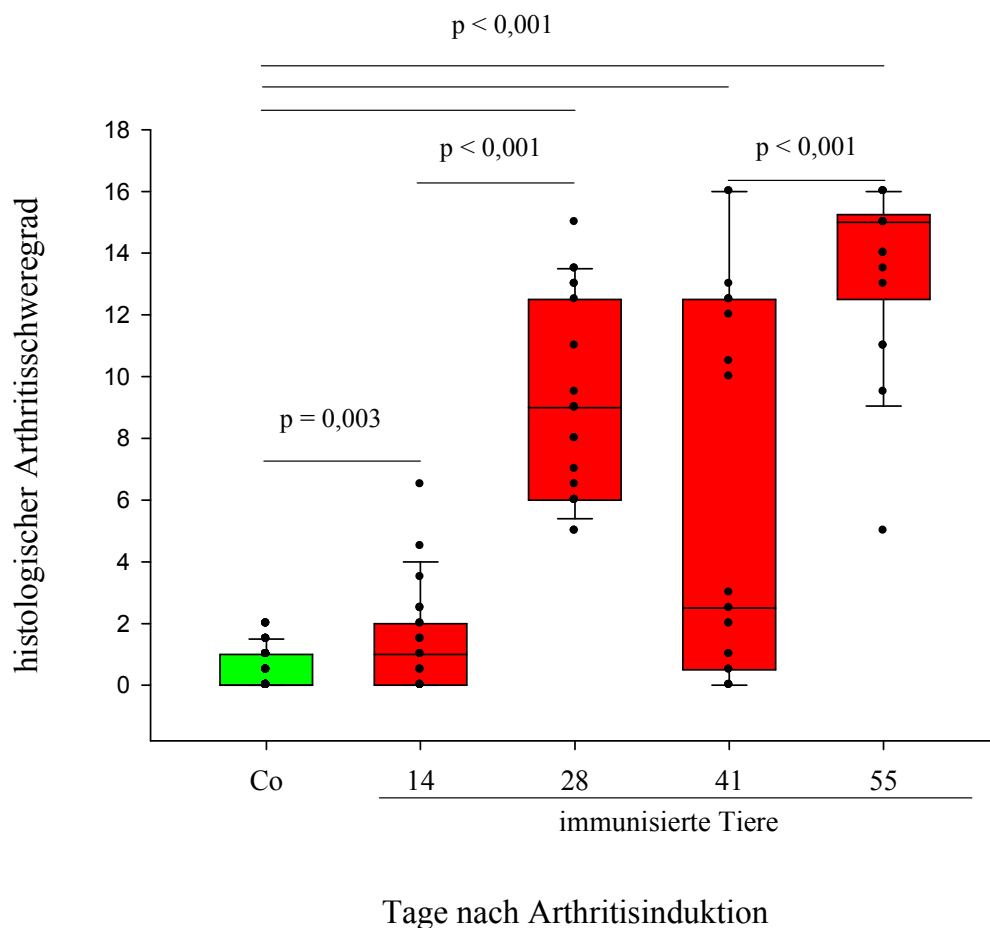
Zur klinischen Beurteilung des Progresses der Kollagen II-induzierten Arthritis und Korrelation mit dem histologischen Arthritisschweregrad wurde ein Scoresystem nach klinischen Symptomen angewendet. Ab dem 28. Tag zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zur Kontrolle (Abb. 4.1). Zwischen dem 14. Tag und dem 28. Tag ließ sich ein signifikanter Unterschied bezüglich des zeitlichen Verlaufs feststellen (Abb. 4.1), die klinische Manifestation der Arthritis erfolgte in diesem Zeitraum.



**Abb. 4.1:** Klinischer Arthritisschweregrad bei immunisierten DA Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren (Co) im zeitlichen Verlauf.

#### 4.1.2 Entzündungshistologie

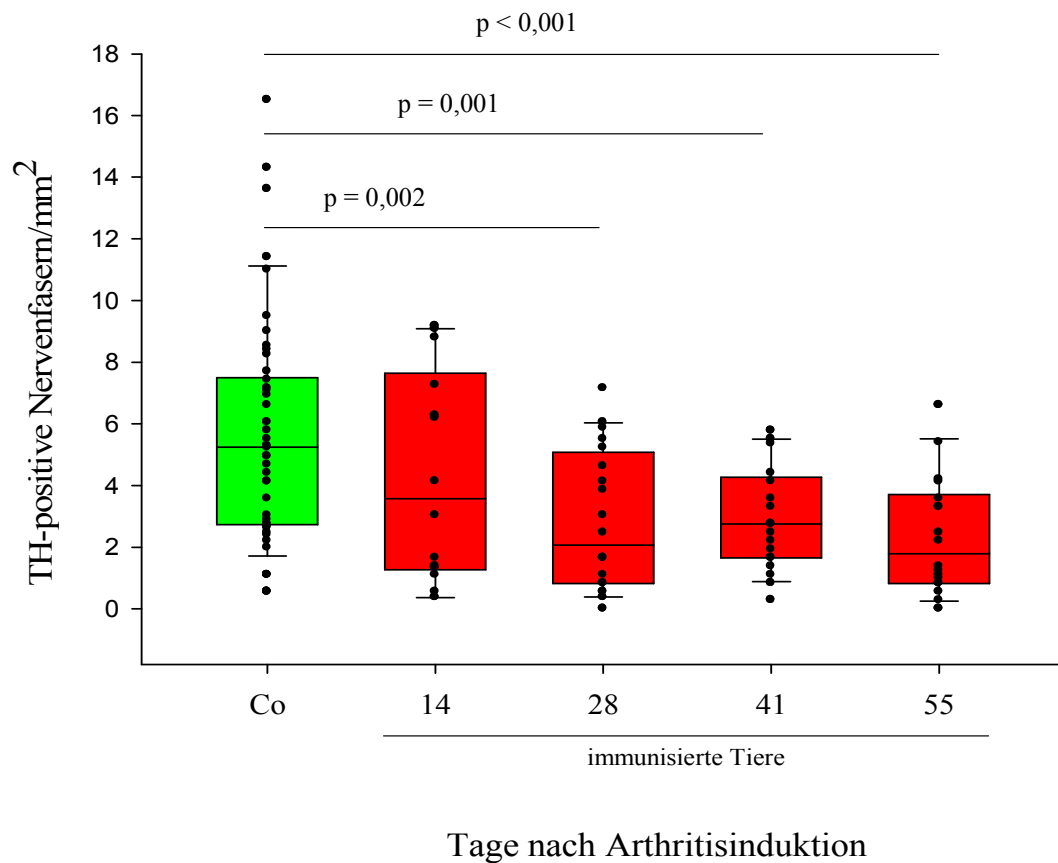
Der arthritische Schweregrad wurde histologisch anhand eines Scoresystems beurteilt. Ab dem 14. Tag nach Arthritisinduktion ließ sich ein signifikanter Unterschied zu den gesunden Tieren der Kontrolle feststellen, der sich im weiteren Verlauf als hochsignifikant darstellte (Abb. 4.2). Bezüglich des Fortschreitens der Entzündung zeigte sich zwischen Tag 14 und 28 sowie zwischen Tag 41 und Tag 55 ein signifikanter Unterschied (Abb. 4.2). Die Entzündung ließ sich histologisch früher als klinisch feststellen, eine fulminante Verschlechterung fand zwischen dem 14. und 28. Tag statt (Abb. 4.2), was mit der Klinik korrelierte (Abb. 4.1).



**Abb. 4.2:** Histologischer Entzündungsgrad in den Gelenken der arthritischen Tiere im Vergleich zur Kontrolle (Co).

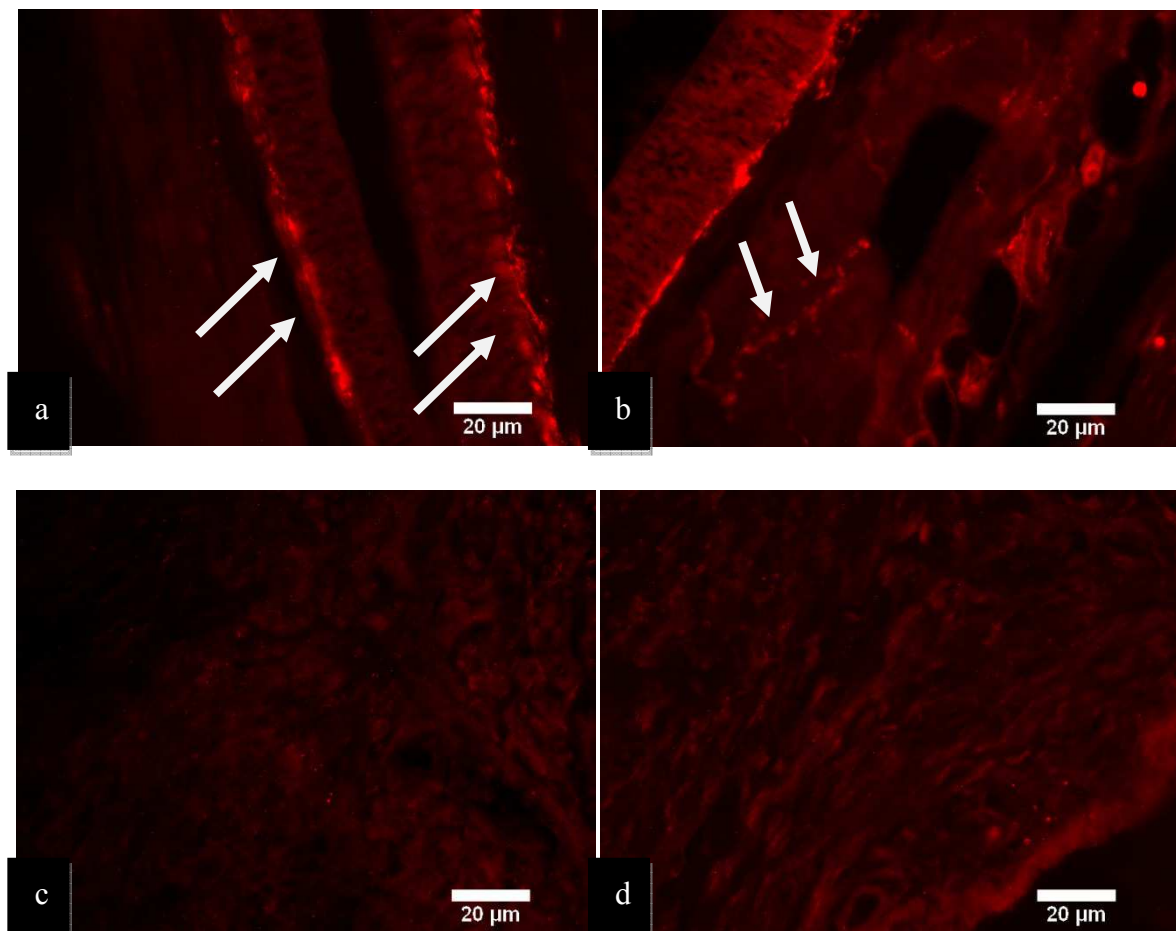
#### 4.1.3 Sympathische Nervenfasern

Es erfolgte die Bestimmung der sympathischen Nervenfasern im periartikulären Gewebe. Ab dem 28. Tag zeigte sich eine signifikante Abnahme der TH-positiven Nervenfasern/mm<sup>2</sup> im Vergleich zu den gesunden Tieren der Kontrollgruppe (Abb. 4.3). Dieser Befund korrelierte mit der Klinik und den histologischen Veränderungen. Die Abnahme der Nervenfasern stellte sich im weiteren Verlauf als hochsignifikant dar (Abb.4.3). Bezüglich des Fortschreitens des Nervenfaserverlustes zeigten sich zwischen Tag 14, 28, 41 und 55 keine signifikanten Unterschiede (Abb.4.3).



**Abb. 4.3:** Anzahl der Tyrosin-Hydroxylase-positiven (sympathischen) Nervenfasern/mm<sup>3</sup> der arthritischen Tiere im Vergleich zur Kontrolle (Co).

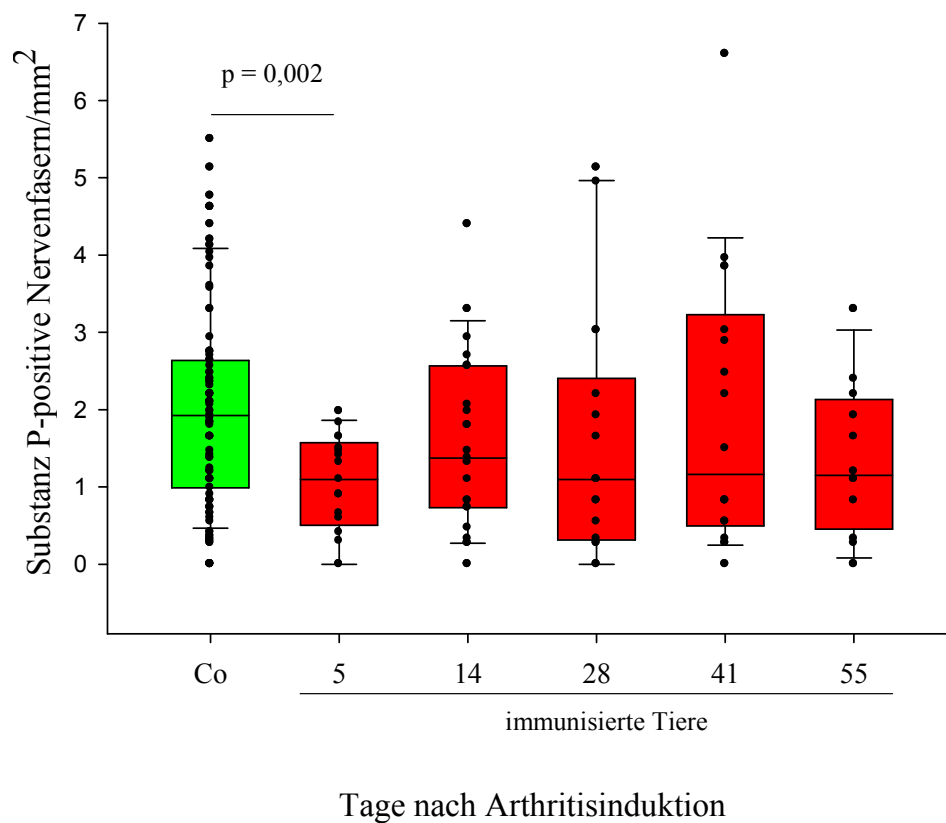
Repräsentative Mikrophotographien fluoreszenz-gefärbter Tyrosin-Hydroxylase-positiver (sympathischer) Nervenfasern bei gesunden und arthritischen Tieren (Abb.4.4). Es zeigen sich sympathische Nervenfasern in typischer Lage entlang eines Blutgefäßes (Abb. 4.4 a) sowie im periartikulären Gewebe bei gesunden Tieren (Abb. 4.4 b). Bei kranken Tieren zeigen sich im periartikulären Gewebe (Abb. 4.4 c) sowie im Gefäßverlauf (Abb. 4.4 d) keine bis wenige sympathische Nervenfasern.



**Abb. 4.4:** a: sympathische Nervenfasern in typischer Lage entlang eines Blutgefäßes (→) b: sympathische Nervenfasern im direkten periartikulären Gewebe (→) c: periartikuläres Gewebe ohne sympathische Nervenfasern d: keine sympathischen Nervenfasern im Gefäßverlauf

#### 4.1.4 Substanz P-positive Nervenfasern

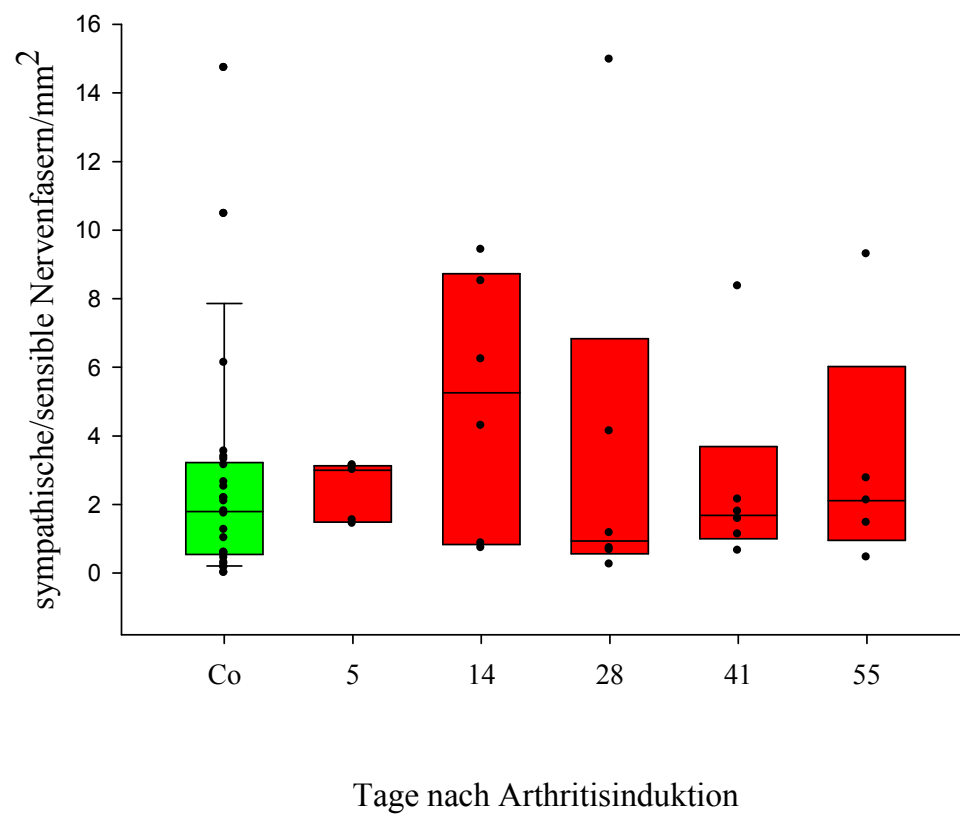
Es erfolgte die Bestimmung der Substanz P-positiven Nervenfasern. Am 5.Tag fanden sich signifikant weniger Substanz P-positiver Nervenfasern im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.5). Keine Unterschiede waren im weiteren Verlauf zu erkennen.



**Abb. 4.5:** Anzahl der Substanz P-positiven Nervenfasern der arthritischen Tiere im Vergleich zur Kontrolle (Co).

#### 4.1.5 Quotient aus sympathischen und Substanz P-positiven Nervenfasern

Zur Ermittlung des Verhältnisses zwischen sympathischen und Substanz P-positiven Nervenfasern wurde der Quotient aus ihnen im zeitlichen Verlauf der Arthritis ermittelt. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des Quotienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bzw. im zeitlichen Verlauf (Abb. 4.6).



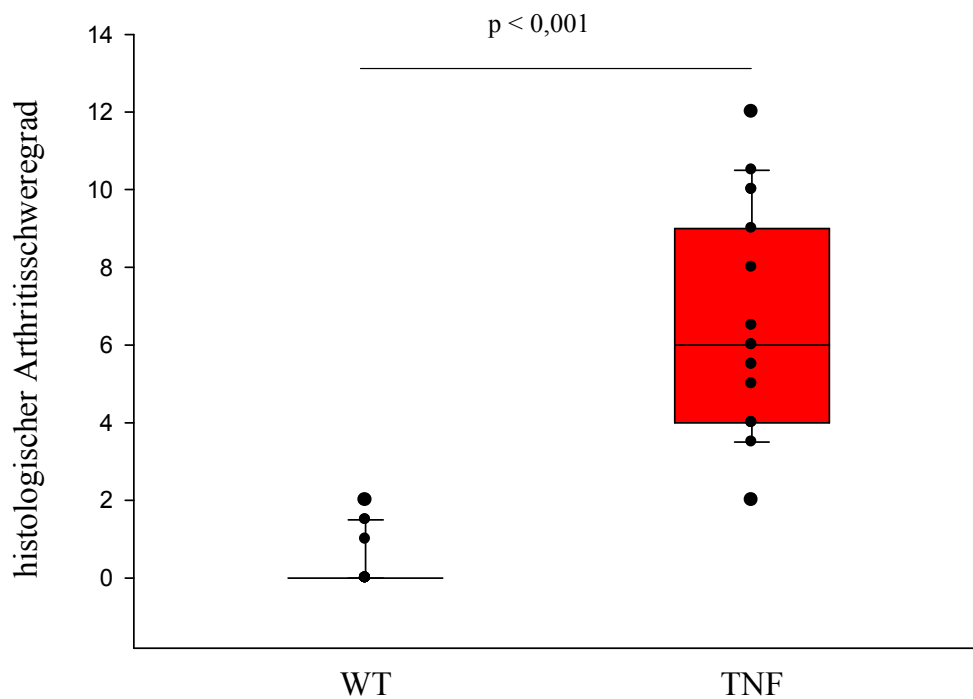
**Abb. 4.6:** Veränderung des Quotienten aus sympathischen und Substanz P-positiven Nervenfasern/mm<sup>2</sup> im Vergleich zur Kontrolle (Co).



## 4.2 TNF-transgene Mäuse

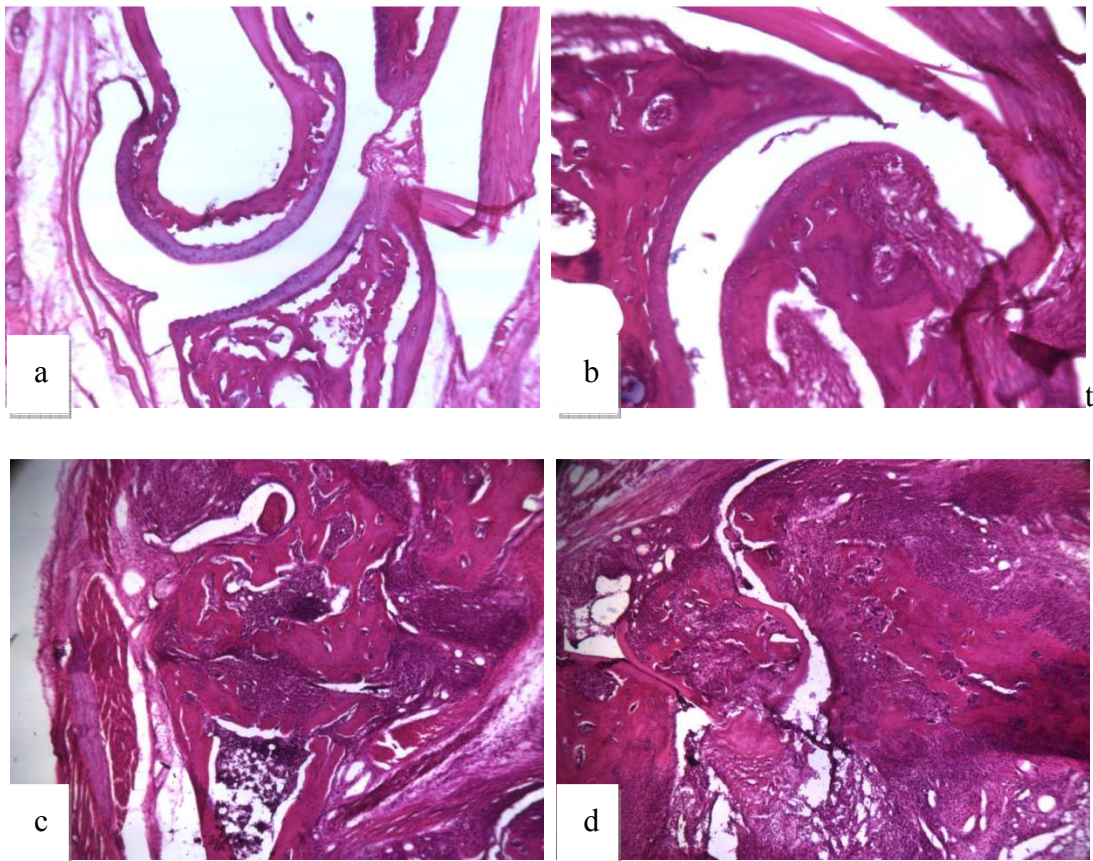
### 4.2.1 Entzündungshistologie

Es erfolgte eine Darstellung der histologischen Entzündung bei TNF-transgenen Mäusen im Vergleich zum gesunden Wildtyp. Bei den TNF-transgenen Tieren zeigte sich eine hochsignifikante Zunahme des histologischen Arthritisschweregrades (Abb. 4.7).



**Abb. 4.7:** Histologischer Arthritisschweregrad der TNF-transgenen Mäuse (TNF) im Vergleich zum Wildtyp (WT).

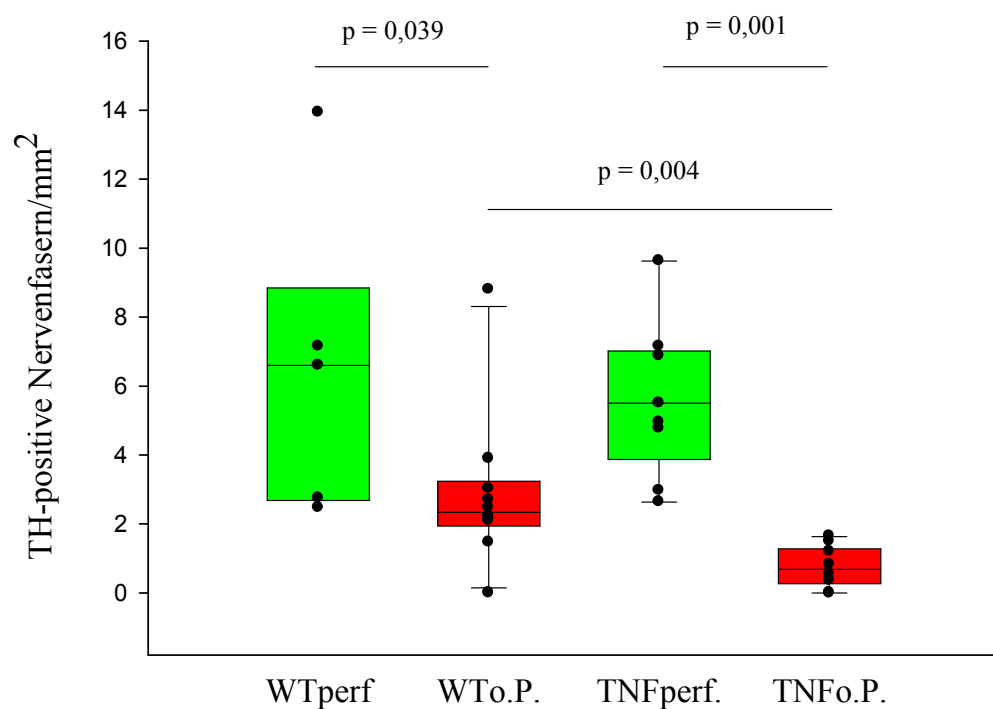
Histologisch zeigt sich in den Gelenken gesunder Tiere ein freier, nicht verschmälertes Gelenkspalt. Das Synovialgewebe ist zart und nicht verdickt, die Struktur von Knorpel und Knochen ist intakt (Abb. 4.8 a). Nach wenigen Tagen zeigen sich erste arthritische Veränderungen bei den TNF-transgenen Tieren im Sinne eines verdickten Synovialgewebes (sogenanntes zellkernreiches Pannusgewebe) welches Knochen und Knorpel infiltriert (Abb. 4.8 b). Im weiteren zeitlichen Verlauf kommt es bei den erkrankten Tieren zu einer Ankylosierung der Gelenke. Der Gelenkspalt ist mit Pannusgewebe ausgefüllt, der Knochen ist stark infiltriert und der Gelenkknorpel weitgehend zerstört (Abb. 4.8 c+d).



**Abb. 4.8:** Repräsentative Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der TNF-transgenen Mäuse (b-d) und des Wildtyps (a); a: gesundes Gelenk; b: beginnende arthritische Veränderungen; c+d: ankylosiertes Gelenk;

#### 4.2.2 Sympathische Nervenfasern

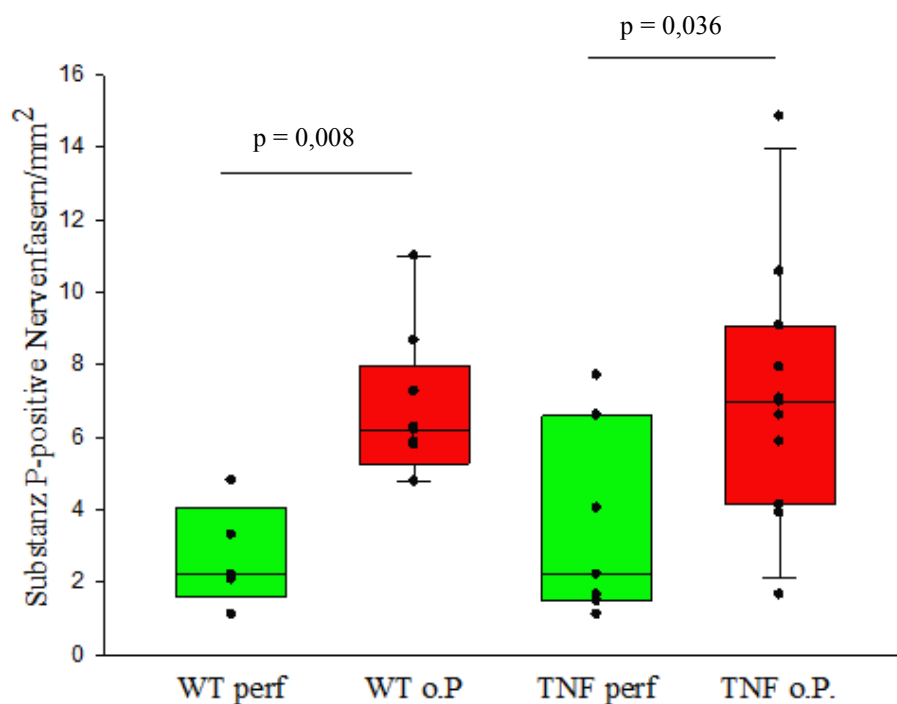
Es erfolgte eine Bestimmung der sympathischen Nervenfasern bei gesunden und TNF-transgenen Tieren sowie der Vergleich unterschiedlicher Konservierungsmethoden. Betrachtet man die Anzahl sympathischer Nervenfasern in Gruppen, welche mit der gleichen Methode konserviert wurden, so fand sich in der Gruppe ohne Perfusion für den Wildtyp (WTo.P.) eine signifikant höhere Anzahl TH-positiver Fasern im Vergleich zu TNF-transgenen Tieren (TNFo.P, Abb. 4.9). Für die „perfundierte“ Gruppe (WTperf bzw. TNFperf) ergab sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied (Abb.4.9). Beim Vergleich der Konservierungsmethoden fand sich jeweils in den Gruppen, welche mit Perfusion behandelt wurden, eine signifikant höhere Anzahl sympathischer Nervenfasern (Abb.4.9).



**Abb. 4.9:** Anzahl Tyrosin-Hydroxylase-positiver (sympathischer) Nervenfasern im Vergleich zwischen Wildtyp und TNF-transgenen Mäusen sowie Anzahl der Nervenfasern im Vergleich zweier Konservierungsmethoden.

#### 4.2.3 Substanz P-positive Nervenfasern

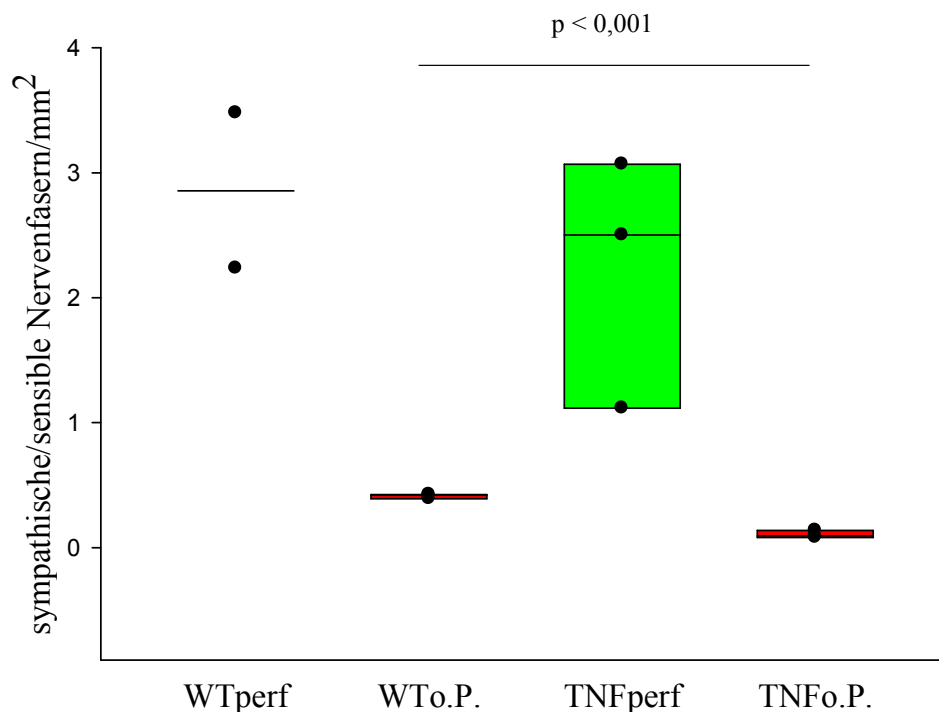
Es erfolgte eine Bestimmung der Substanz P-positiven Nervenfasern bei gesunden und TNF-transgenen Tieren sowie der Vergleich unterschiedlicher Konservierungsmethoden. Bei Betrachtung der Anzahl Substanz P-positiver Nervenfasern in Gruppen gleicher Konservierungsmethode fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und TNF-transgenem Typ (Abb. 4.10). Beim Vergleich der unterschiedlichen Konservierungsmethoden fand sich jeweils in den Gruppen, die ohne Perfusion behandelt wurden, eine signifikant höhere Anzahl Substanz P-positiver Nervenfasern im Vergleich zur mit Perfusion behandelten Gruppe (Abb. 4.10).



**Abb.4.10:** Anzahl Substanz P-positiver Nervenfasern im Vergleich zwischen Wildtyp und TNF-transgenen Mäusen und Vergleich verschiedener Konservierungsmethoden.

#### 4.2.4 Quotient aus sympathischen und Substanz P-positiven Nervenfasern

Zur Ermittlung des Verhältnisses zwischen sympathischen und Substanz P-positiven Nervenfasern wurde der Quotient aus ihnen im zeitlichen Verlauf der Arthritis ermittelt. In der nicht perfundierten Gruppe war der Quotient beim Wildtyp hochsignifikant größer als bei TNF-transgenen Tieren (Abb. 4.11). Bei Betrachtung der unterschiedlichen Konservierungsformen war in der TNF-transgenen Gruppe der Quotient bei den perfundierten Tieren signifikant größer als bei den nicht perfundierten Tieren (Abb. 4.11).

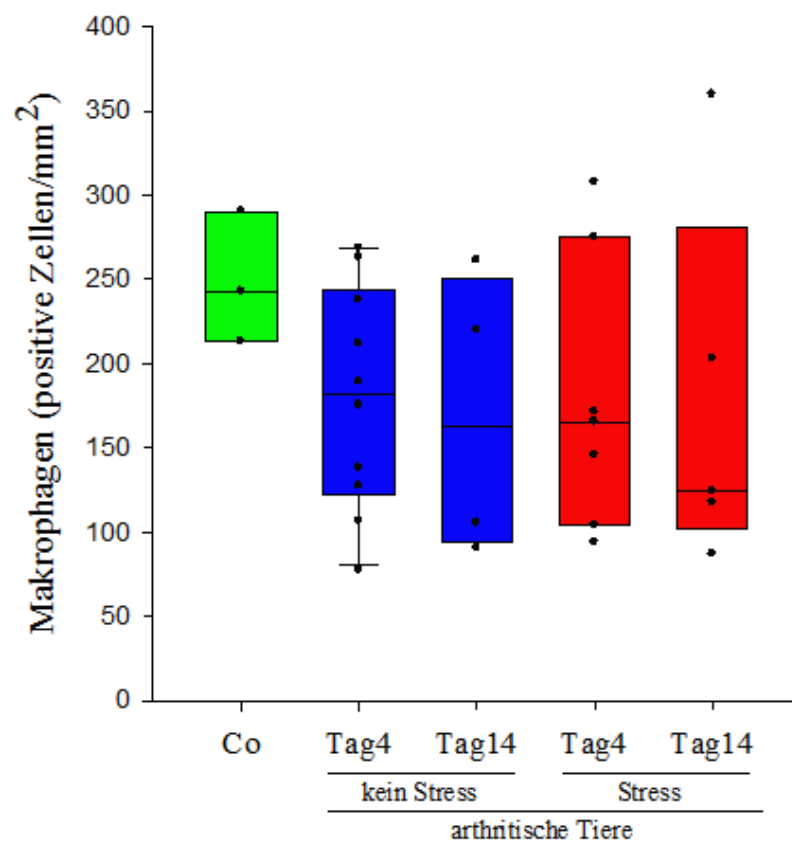


**Abb. 4.11:** Quotient aus sympathischen und Substanz P-positiven Nervenfasern/mm<sup>2</sup> im Vergleich zwischen Wildtyp und TNF-transgenen Tieren, sowie Einfluss unterschiedlicher Konservierungsformen.

### 4.3 Psychosozialer Stress bei Kollagen-II-induzierter Arthritis (Wistarratten)

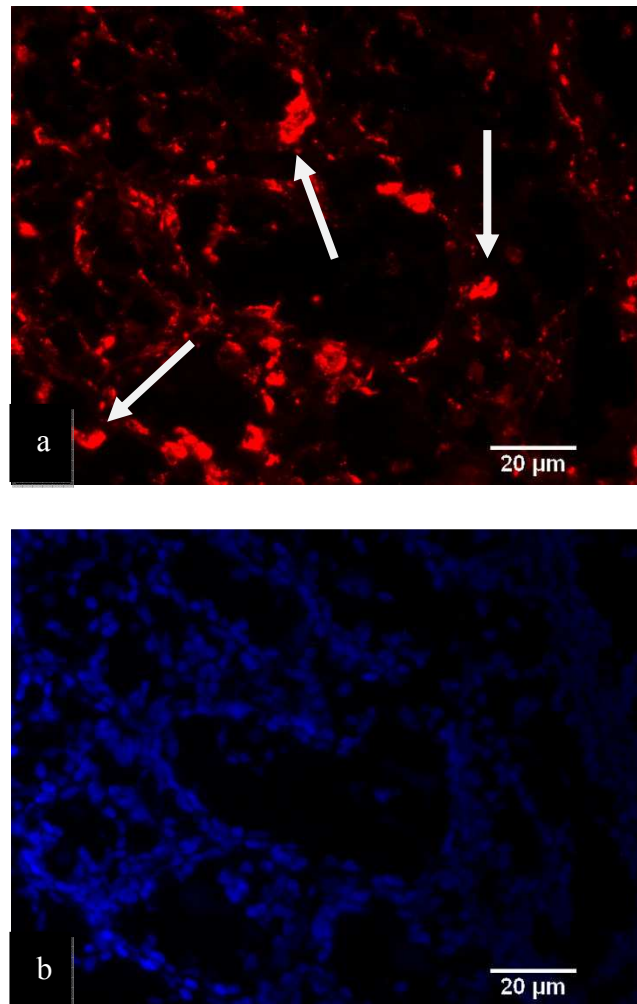
#### 4.3.1 Makrophagen im Lymphknoten

Im Rahmen der Untersuchungen der Auswirkungen von psychosozialem Stress auf die Zellproliferation bzw. die Vermehrung immunkompetenter Zellen im Lymphknoten erfolgte eine quantitative Bestimmung von Makrophagen im Lymphknoten bei gestressten und nicht gestressten Tieren. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen gestressten und nicht gestressten Tieren sowie im zeitlichen Verlauf (Co = nicht immunisierte Tiere) (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12:** Makrophagen in den Lymphknoten gestresster und nicht gestresster Tiere.

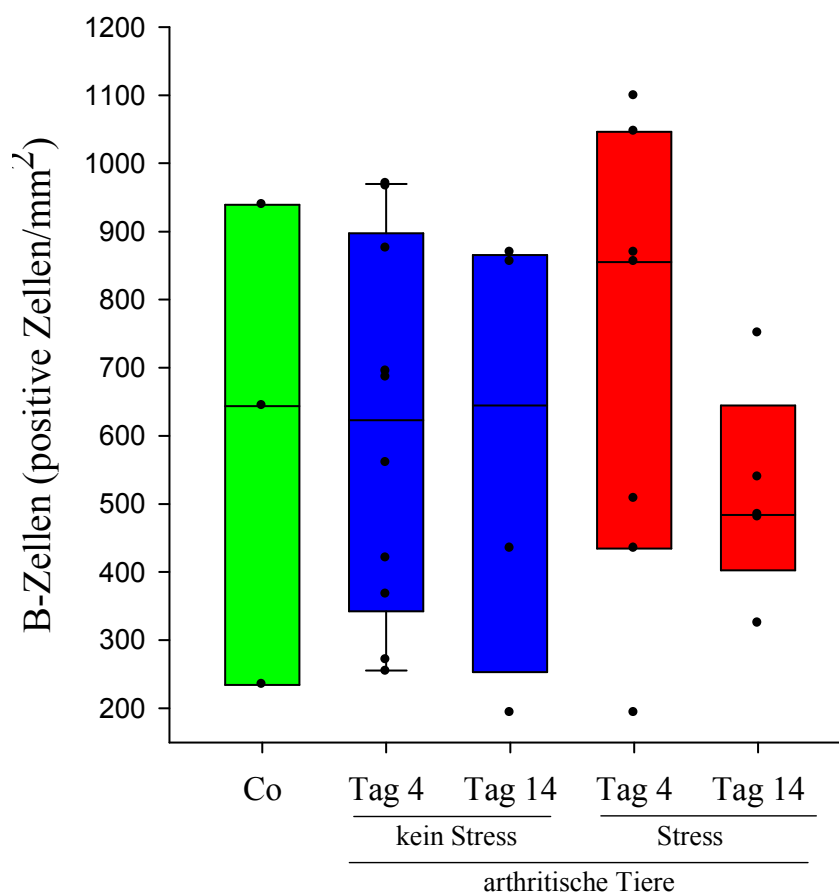
Bei der Auszählung von Makrophagen in Lymphknoten gestresster und nicht gestresster Tiere imponierten bildmorphologisch unter dem Fluoreszenzmikroskop keine Unterschiede (Abb. 4.13).



**Abb. 4.13:** *a: repräsentative Mikrophotographie von Makrophagen im Lymphknotengewebe. b: Mikrophotographie desselben Ausschnitts; sämtliche Zellkerne wurden mit Dapi angefärbt.*

#### 4.3.2 B-Lymphozyten in Lymphknoten

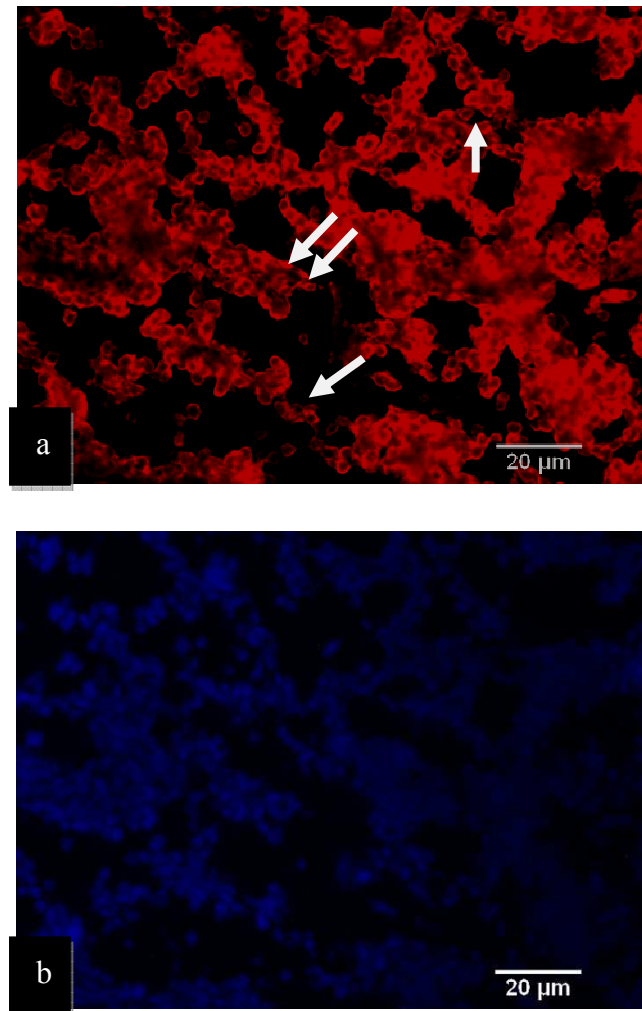
Als weiterer Vertreter immunkompetenter Zeller wurden die B-Lymphozyten in Lymphknoten gestresster und nicht gestresster Tiere bestimmt. Es waren keine Unterschiede zwischen der gestressten und nicht gestressten Gruppe nachweisbar (Abb. 4.14). Auch konnten keine Unterschiede zwischen arthritischen Tieren und den Kontrolltieren (Co) gesehen werden (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14:** B-Lymphozyten in Lymphknoten gestresster und nicht gestresster Wistarratten.



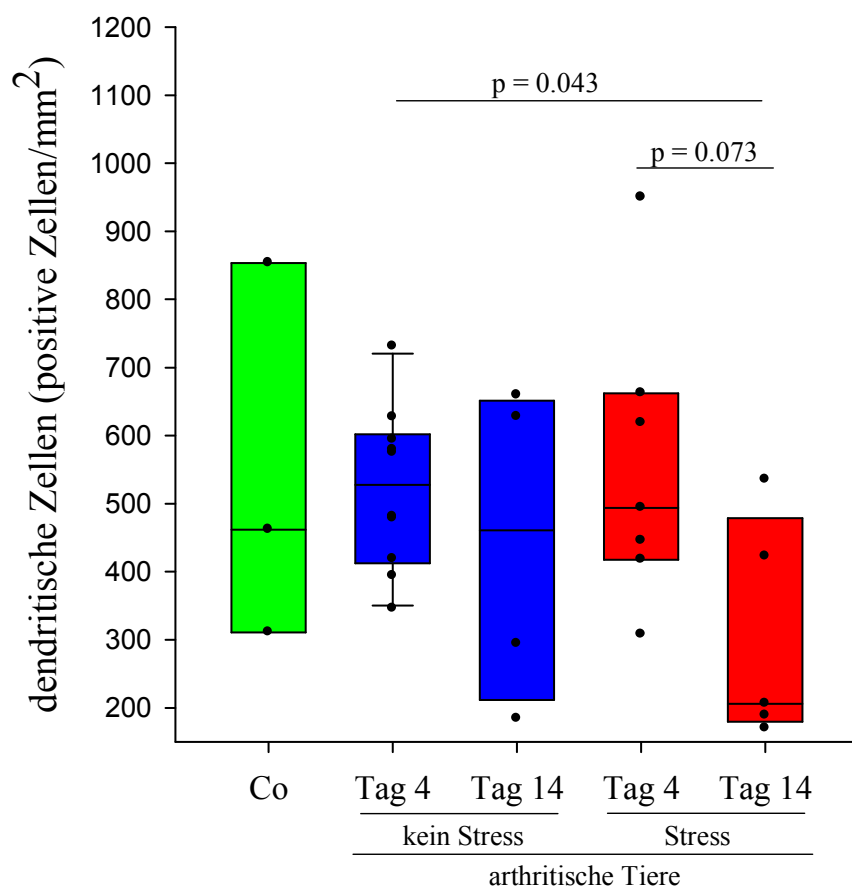
Bei der Auszählung von B-Lymphozyten in Lymphknoten gestresster und nicht gestresster Tiere imponierten bildmorphologisch unter dem Fluoreszenzmikroskop keine Unterschiede (Abb. 4.15).



**Abb. 4.15:** *a: repräsentative Mikrophotographie von B-Lymphozyten im Lymphknoten; b: Mikrophotographie desselben Ausschnitts; sämtliche Zellkerne wurden mit Dapi angefärbt;*

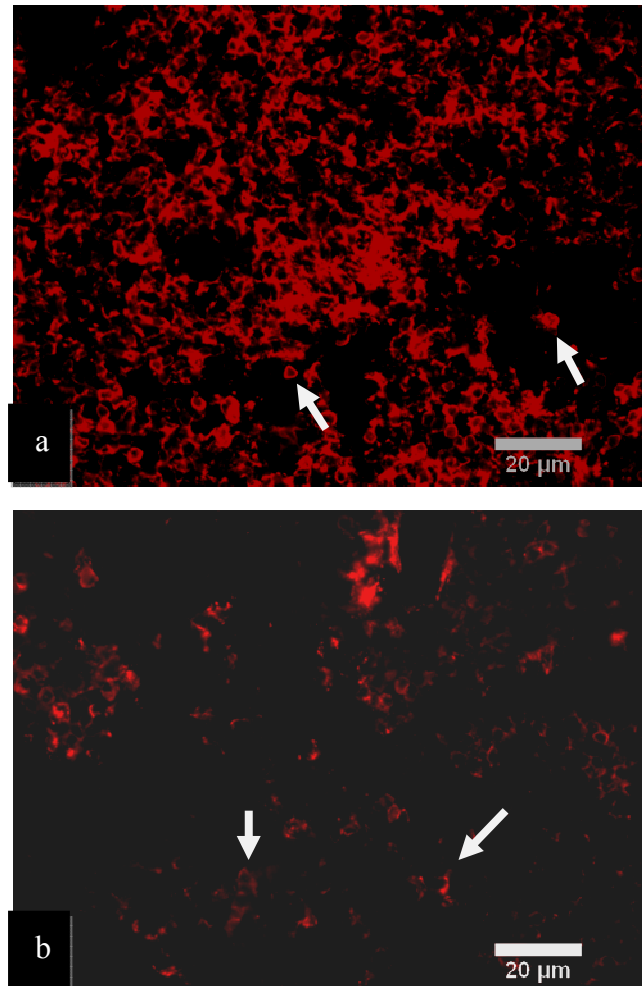
#### 4.3.3 Dendritische Zellen im Lymphknoten

Als weitere Vertreter immunkompetenter Zellen erfolgte die Bestimmung dendritischer Zellen im Lymphknoten. Bei den nicht gestressten Tieren fand sich am 4. Tag eine signifikant höhere Anzahl dendritischer Zellen pro Quadratmillimeter im Lymphknoten als bei den gestressten Tieren am 14. Tag (Abb. 4.16). Tendenziell weniger dendritische Zellen fanden sich innerhalb der Stressgruppe am 14. Tag (Abb. 4.16).



**Abb. 4.16:** Dendritische Zellen im Lymphknoten gestresster und nicht gestresster arthritischer Tiere.

Bei der Auszählung der dendritischen Zellen zeigten sich bildmorphologisch bei gestressten Tieren weniger Zellen als bei nicht gestressten Tieren (Abb. 4.17).

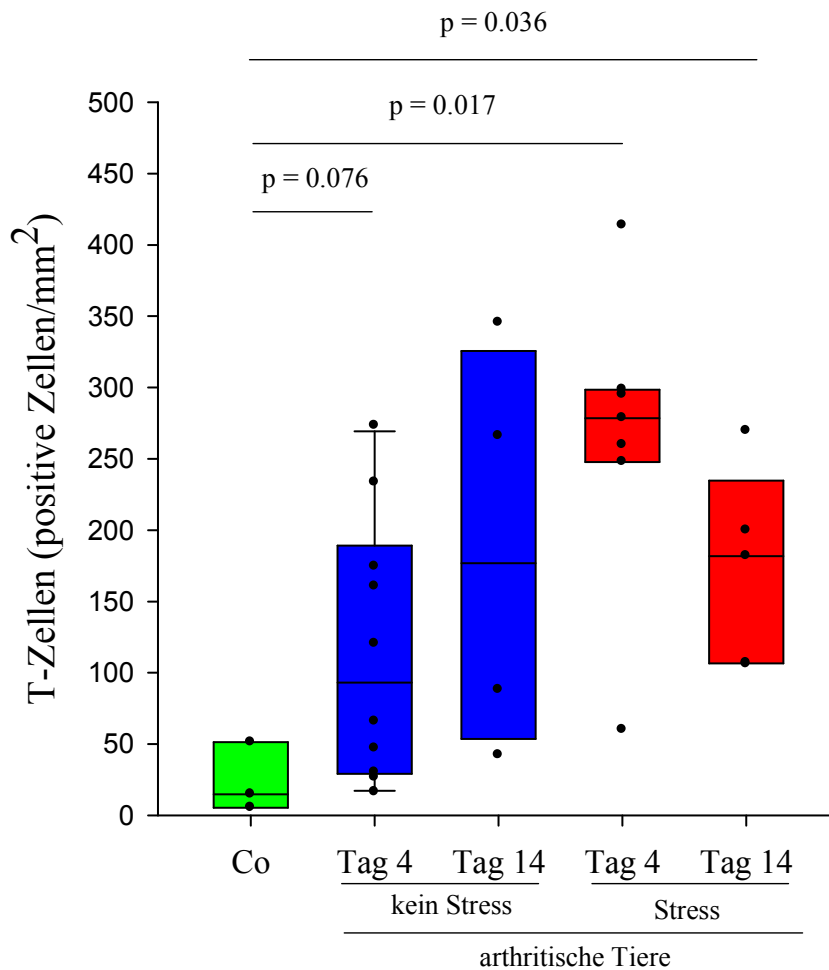


**Abb. 4.17:** repräsentative Mikrophotographien von dendritischen Zellen im Lymphknoten eines nicht gestressten Tieres am 4. Tag (a) und eines gestressten Tieres am 14. Tag (b)

#### 4.3.4 T-Lymphozyten im Lymphknoten

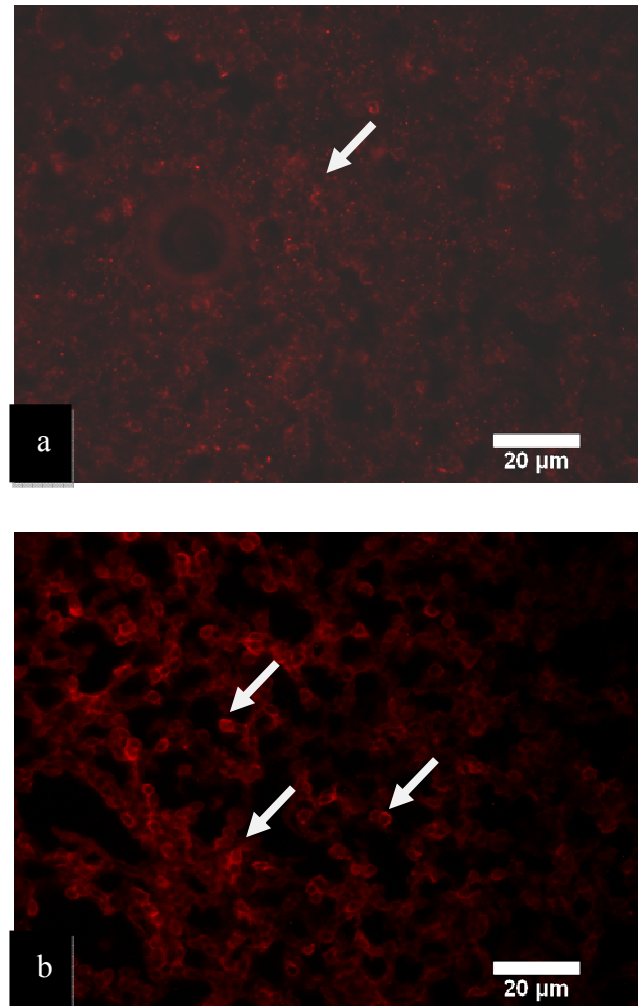
Als weitere Vertreter immunkompetenter Zellen erfolgte eine Bestimmung der T-Lymphozyten in Lymphknoten gestresster und nicht gestresster Tiere. Für die nicht gestressten arthritischen Tiere ergab sich am 4. Tag eine tendenziell größere Anzahl von T-Lymphozyten im Vergleich zu den Kontrolltieren (Co, Abb. 4.18). Bei den ge-

stressten arthritischen Tieren fand sich vor allem am 4. Tag eine signifikant höhere Anzahl an T-Lymphozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4.18). Bei den arthritischen Tieren zeigte sich zwischen gestressten und nicht gestressten Wistarratten kein signifikanter Unterschied (Abb. 4.18).



**Abb. 4.18:** T-Lymphozyten in Lymphknoten gestresster und nicht gestresster Wistarratten.

Bei der Auszählung der T-Lymphozyten zeigten sich bildmorphologisch Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den gestressten arthritischen Tieren (Abb. 4.19).



*Abb. 4.19: Repräsentative Mikrophotographien von T-Lymphozyten im Lymphknoten eines nicht gestressten, nicht immunisierten Tieres (Kontrolle, a) und eines gestressten arthritischen Tieres (b)*

## **5 Diskussion**

### **5.1 Kollagen-II-induzierte Arthritis (DA-Ratten)**

#### **5.1.1 Klinische und histologische Untersuchungen**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen basieren auf der Induktion einer Modellarthritis. Bei den DA-Ratten wurde diese durch die Injektion von Kollagen Typ II, welches in Freund' Adjuvant gelöst war, erreicht. Dieses Verfahren eignet sich gut um die pathophysiologischen Vorgänge einer RA beim Menschen nachzuvollziehen, da die im Rahmen der Erkrankung eintretenden Veränderungen jenen beim Menschen ähneln. So entsprechen die veränderten Glukokortikoidkonzentrationen bei Ratten mit induzierter Modellarthritis denen bei Menschen mit RA.<sup>111+112</sup> Dies entspricht der bei RA auftretenden Insuffizienz der HPN-Achse. So ist davon auszugehen, dass sich die Ergebnisse der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen durchaus auf die pathophysiologischen Vorgänge beim Menschen übertragen lassen. Um eine Korrelation zwischen den klinischen und histologischen Veränderungen sowie den quantitativen Veränderungen der Nervenfasern zu erstellen, wurde an Hand zu Beginn festgelegter klinischer und histologischer Score-Systeme eine Klassifizierung der Arthritis vorgenommen. Klinische Score-Systeme beurteilen den Schweregrad der Arthritis am Tiermodell vor allem hinsichtlich der Schwellung und Rötung der Pfoten bzw. einzelner Gelenke sowie hinsichtlich des Funktionsverlustes des Gelenks bzw. der ganzen Extremität.<sup>35+48</sup> Gemäß dieser Kriterien wurde auch die Arthritis der DA Ratten in der vorliegenden Untersuchung beurteilt. Dabei zeigte sich zwischen dem 14. und 28. Tag nach Arthritisinduktion eine sprunghafte Verschlechterung der Klinik.

Zur Analyse von histologischen Veränderungen sind verschiedene Score-Systeme entwickelt worden, die sich zur Beurteilung der Gewebeveränderung zumeist ähnlicher Kriterien bedienen. Koizumi und Mitarbeiter schließen unter anderem die Knochendestruktion und das Vorkommen von Hämosiderin und Fremdkörpergranulomen in ihren Score ein.<sup>10</sup> Andere Arbeitsgruppen wie die von Krenn distanzieren sich bewusst von einer Beurteilung von Details, indem sie sich in ihrem Synovialitis-Scoring auf die Bewertung der Verdickung der synovialen Deckzellschicht, des Aktivierungs-

grads des synovialen Stromas und der leukozytären entzündlichen Infiltration beschränken.<sup>113</sup> In der vorliegenden Untersuchung war das primäre Ziel bei der Erstellung eines histologischen Score-Systems die Klassifikation des Schweregrades der Entzündung, weshalb das Augenmerk vor allem auf die Beurteilung der periartikulären Gewebe und des Gelenkspaltes gelegt wurde. Auffallend war, dass sich bereits ab dem 14. Tag signifikante histologische Veränderungen in den Gelenken feststellen ließen, während die Klinik zu diesem Zeitpunkt noch unauffällig war. Ab dem 28. Tag, der wie oben erwähnt mit einer deutlichen Verschlechterung der Klinik einherging, zeigten sich dann hochsignifikante histologische Veränderungen; damit konnte eine positive Korrelation zwischen Histologie und Klinik nachgewiesen werden. In einigen anderen Untersuchungen konnte hingegen keine Korrelation zwischen der klinischen Beschwerdesymptomatik und den histologischen Veränderungen gefunden werden.<sup>114</sup>

#### 5.1.2 Sympathische Nervenfasern

In der vorliegenden Untersuchung erfolgte die Sichtbarmachung der sympathischen Nervenfasern über den Nachweis der Tyrosin-Hydroxylase, einem Enzym, das bei der Synthese von Noradrenalin aus Phenylalanin für die Hydroxylierung von Tyrosin zu Dopa zuständig ist.<sup>44</sup> Noradrenalin wird hauptsächlich in der Nebenniere und adrenergen Nervenendigungen synthetisiert, wodurch sich die TH zum quantitativen Nachweis sympathischer Nervenzellen eignet.

Es konnte gezeigt werden, dass es bei den arthritischen Tieren im Krankheitsverlauf zu einem signifikanten Abfall der sympathischen Nervenfasern im periartikulären Gewebe kommt. Diese Abnahme stellte sich ab dem 28. Tag als signifikant dar, was sowohl mit dem histologischen als auch mit dem klinischen Arthritisschweregrad korreliert. Ein Verlust sympathischer Nervenfasern konnte bereits in anderen Untersuchungen sowohl am Tiermodell als auch bei Patienten mit RA bestätigt werden.<sup>77+79+115</sup> Es bleibt zu erörtern, worin dieser Abfall begründet ist. Möglich wäre zum Einen ein direkter Untergang der Nervenzellen im Rahmen der Erkrankung oder aber ein fehlendes Einsprossen in das sich ausbildende Pannusgewebe bzw. eine Kombination aus beidem. Eine potentielle Erklärung für dieses Phänomen ist ein erhöhtes Vorkommen von Semaphorinen, bei welchen es sich um Repulsationsfaktoren von Nervenfasern han-

delt.<sup>116</sup> So konnte vor allem für Semaphorin 3 C, das sich selektiv gegen sympathische Nervenfasern richtet, gezeigt werden, dass es in Makrophagen und Fibroblasten im Synovium von Patienten mit RA vermehrt auftritt.<sup>117</sup> Denkbar wäre auch, dass die Denervierung im Rahmen der Aktivierung lokaler Immunzellen auftritt, zumal nachgewiesen werden konnte, dass die sympathischen Nervenfasern in Lymphknoten von Mäusen, die eine Autoimmunerkrankung entwickelt haben, ebenfalls abnimmt.

Der beobachtete Verlust sympathischer Nervenfasern im Verlauf einer Arthritis wirft die Frage auf, welche Bedeutung dieses Phänomen für den Krankheitsverlauf besitzt. Wie bereits beschrieben entfaltet Noradrenalin in hohen Konzentrationen vor allem über den  $\beta$ -Adrenozeptor tendenziell antiinflammatorische Wirkungen. Allerdings ist bekannt, dass Noradrenalin in geringeren Konzentrationen über den  $\alpha_2$ -Rezeptor bzw. Adenosin über den A1-Rezeptor eine proinflammatorische Wirkung entfalten kann, was beispielsweise mit einer TNF-Erhöhung einhergeht.<sup>81</sup>

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das sympathische Nervensystem eine duale Rolle im Entzündungsprozess einnimmt bzw. sich die Art der Einflussnahme im zeitlichen Verlauf der Arthritis bzw. der Entzündung verändert. In der Frühphase einer Entzündungsinduktion führt neben dem sensiblen Nervensystem auch das sympathische Nervensystem zu einer Reihe proinflammatorisch wirkender Effekte, beispielsweise durch die chemotaktische Funktion sympathischer Neurotransmitter.<sup>118</sup> Für diesen proinflammatorischen Effekt in der Frühphase einer Entzündung spricht auch die Beobachtung, dass Tiere, bei welchen ebenfalls eine Kollagen II-Arthritis induziert wurde und die einer frühen Sympathektomie unterzogen wurden, einen weniger fulminanten Krankheitsverlauf zeigten.<sup>79</sup> Die antiinflammatorischen Effekte des sympathischen Nervensystems entfalten sich im weiteren Verlauf einer Entzündung wie bereits oben ausgeführt beispielsweise über die Hemmung der Phagozytose über  $\beta$ -Adrenozeptoren.<sup>62</sup> Diese Feststellung wird durch die Beobachtung gestützt, dass spätsympatektomierte Tiere einen schwereren Verlauf der Arthritis zeigen.<sup>79</sup> Durch den Nervenfaserverlust herrschen im Entzündungsgebiet niedrige Konzentrationen von Noradrenalin vor, wodurch sich lokal primär  $\alpha_2$ -Rezeptor vermittelte Wirkungen entfalten, d.h. ein proinflammatorisches Milieu im entzündeten Gelenk vorherrscht. Der physiologische Nutzen dahinter könnte sein, die Entzündung auf einen umschriebenen Ort zu begrenzen.



### 5.1.3 Substanz P-positive Nervenfasern

Substanz P-positive Nervenfasern wurden in der vorliegenden Untersuchung direkt über den Nachweis des Transmitters Substanz P nachgewiesen. Substanz P entfaltet über verschiedene Wege proinflammatorische Effekte, die nachgewiesenermaßen zur Entzündungsverstärkung beitragen.<sup>84</sup> In einigen Untersuchungen konnte eine Zunahme Substanz P-positiver Fasern im Synovialgewebe nachgewiesen werden, was mit einer Abnahme der sympathischen Nervenfasern einherging.<sup>79</sup> Erst im späteren Verlauf der Entzündung fand sich eine Abnahme dieser sensiblen Fasern. Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden; hier fand sich keine relevante Abnahme der Substanz P-positiven Nervenfasern. Allerdings konnte so nachgewiesen werden, dass der Einfluss der Substanz P-positiven Fasern im Gegensatz zu den sympathischen Nervenfasern nicht abnimmt, also mit einer relativen Zunahme einhergeht, was wiederum, geht man von einer potentiell antiinflammatorischen Funktion sympathischer Nervenfasern bei RA aus, eine Verschiebung in ein tendenziell proinflammatorisches Milieu bedeutet. Besonders deutlich wäre diese Verschiebung durch eine Veränderung des sogenannten TH/SP-Quotienten geworden, der das Verhältnis von NA- und Substanz P-produzierenden Fasern darstellt; allerdings stellte sich in den vorliegenden Untersuchungen keine derartige Veränderung dar.

Bisher ist nicht bekannt, warum die Substanz P-positiven Fasern keiner Reduktion unterliegen und in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen sogar mit einer Zunahme imponieren. In diesem Zusammenhang ist auch zu bemerken, dass für eine andere Klasse sensibler Neuronen, in welchen calcitonin gene-related peptide als Transmitter fungiert, sogar eine Abnahme im arthritischen Gewebe festgestellt wurde und somit der Einfluss von Substanz P wiederum steigt.<sup>88</sup> Ein weiterer Forschungsansatz besteht darin herauszufinden, welche Mediatoren zu einer Zunahme von Substanz P-positiven Fasern führen; dabei wird auch versucht, eine Möglichkeit zu finden um diese zu blockieren. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Untersuchung festgestellt werden, dass sich im Rahmen der Modellarthritis eine Veränderung der neuronalen Einflüsse auf das Entzündungsgeschehen ergibt. Es kommt zu einem Verlust der sympathischen Nervenfasern und damit zu einer zumindest relativen Zunahme der Substanz

P-positiven Nervenfasern, was mit großer Wahrscheinlichkeit eine Verstärkung der Entzündung zur Folge hat.

## **5.2 TNF-transgene Mäuse**

### **5.2.1 Entzündungshistologie**

Eine andere Art der Arthritisinduktion erfolgte bei TNF-transgenen Mäusen. Als Träger des Gens, welches für den humanen TNF kodiert, entwickelten sie eine chronische Polyarthritis. Dieses Arthritismodell ist ebenfalls zur Untersuchung der pathophysiologischen Vorgänge bei RA geeignet, da TNF eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Erkrankung spielt.<sup>46</sup> In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich bei der histologischen Untersuchung der Gelenke der TNF-transgenen Mäuse eine deutliche Entzündungsreaktion, die einem fulminanten Verlauf einer Arthritis entspricht.

### **5.2.2 Sympathische Nervenfasern**

An den TNF-transgenen Mäusen wurden zwei unterschiedliche Methoden der Gewebefixierung durchgeführt. Die Hälfte der Tiere wurde mittels Perfusion behandelt, die andere Hälfte ohne Perfusion. Bei der quantitativen Untersuchung der sympathischen Nervenfasern konnte für die Gruppe, die nicht mit Perfusion behandelt wurde, ein signifikanter Abfall TH-positiver Nervenfasern im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse der vorausgegangenen Untersuchungen an Ratten, bei denen gezeigt werden konnte, dass im Rahmen der Arthritisentwicklung das sympathische Nervensystem seinen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen verliert. In der mit Perfusion behandelten Gruppe konnte diese Tendenz allerdings nicht nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang sollte jedoch berücksichtigt werden, dass zur Verifizierung dieser Ergebnisse Untersuchungen mit einer größeren Fallzahl notwendig wären.

### 5.2.3 Substanz P-positive Nervenfasern

In den Gruppen mit gleicher Fixierungsmethode fanden sich keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Substanz P-positiven Fasern. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit den DA-Ratten, in denen gezeigt werden konnte dass der Einfluss der Substanz P-positiven Fasern durch den Verlust der sympathischen Nervenfasern relativ zunimmt und damit ein tendenziell proinflammatorisches Milieu geschaffen wird.

Bei der Berechnung des TH/SP-Quotienten ließ sich in der nicht perfundierten Gruppe eine signifikante Erniedrigung des Quotienten bei den TNF-transgenen Tieren im Vergleich zum Wildtyp feststellen, der wiederum die relative Zunahme des Einflusses der Substanz P-positiven Fasern deutlich macht. Auch im Fall der Substanz P-positiven Fasern ist zur Verifizierung der Ergebnisse eine größere Fallzahl notwendig, was Gegenstand weiterer Untersuchungen auf diesem Gebiet sein könnte.

### 5.2.4 Methoden der Konservierung

Bei der Untersuchung der TNF-transgenen Mäuse wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Gewebefixierung angewendet. Betrachtete man die sympathischen Nervenfasern, so fiel auf dass bei perfundierten Tieren sowohl beim Wildtyp als auch bei den TNF-transgenen Tieren jeweils höhere Anzahlen von Nervenfasern gefunden werden konnten als bei Tieren, die nicht perfundiert wurden. Dies legt den Verdacht nahe, dass die Perfusion ein neuronenschutziveres Verfahren darstellt als die Konservierung ohne Perfusion.

Interessanterweise fand sich bei der Untersuchung der sensiblen bzw. Substanz P-positiven Fasern ein gegenteiliger Befund: bei Tieren, deren Gewebe nicht durch Perfusion fixiert wurde, fanden sich sowohl beim Wildtyp als auch bei den TNF-transgenen Tieren signifikant höhere Zahlen Substanz P-positiver Nervenfasern als bei Tieren, die mit Perfusion behandelt wurden.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse die Vermutung nahe, dass für den Nachweis von sympathischen Nervenfasern die Gewebefixierung mittels Perfusion geeigneter ist, da diese möglicherweise ein protektiveres Verfahren darstellt als die Fixierung oh-

ne Perfusion; für den Nachweis Substanz P-positiver Fasern scheint die Konservierung ohne Perfusion das Verfahren der Wahl darzustellen, da bei der Perfusionsmethode unter Umständen Stoffe verwendet werden, die einen neurotoxischen Effekt auf sensible Nervenfasern ausüben. Zur Verifizierung dieser Überlegungen sollten Untersuchungen mit größeren Fallzahlen durchgeführt werden.

### **5.3 Psychosozialer Stress bei Kollagen-II-induzierter Arthritis**

Im Rahmen eines gemeinsamen Projektes mit dem Lehrstuhl für Tierphysiologie der Universität Bayreuth (Arbeitsgruppe Dr. rer. nat. Volker Stefanski) erfolgte die Bestimmung verschiedener Zellpopulationen in Lymphknoten bei Ratten. Ziel des Projektes war es, Auswirkungen von sozialem Stress auf die Manifestation einer Modellarthritis bei der Ratte zu untersuchen, vor allem in Hinblick auf die neuroendokrinen Mechanismen. In dem hier durchgeführten Telexperiment sollten die Auswirkungen von Stress auf die Krankheitsmanifestation während bzw. nach Induktion der Modellarthritis charakterisiert werden.

Der Nachweis der verschiedenen Zellpopulationen erfolgte ebenfalls mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die dabei verwendeten detektierenden Antikörper waren jeweils gegen spezifische Zielproteine der jeweiligen Zellklassen gerichtet. An Hand der Beurteilung des quantitativen Vorkommens verschiedener Immunzellpopulationen im Lymphknoten konnte zunächst eine Einschätzung getroffen werden, ob das Immunsystem überhaupt auf die Induktion der Modellarthritis reagiert; weiterhin konnte eingeschätzt werden, welche Zellen dabei vornehmlich eine Rolle spielen und ob sich Unterschiede in der Aktivierung zwischen gestressten und nicht gestressten Tieren ergeben. Die Untersuchung letzteren Sachverhaltes könnte darüber Aufschluss geben, ob psychosozialer Stress tatsächlich als direkter Einflussfaktor auf die Immunantwort wirkt.

### 5.3.1 Makrophagen

Makrophagen spielen u.a. durch starke Infiltration des Synoviums, Sekretion von TNF und der Aktivierung von T-Lymphozyten eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie der Entzündung. Damit wäre zu erwarten, dass sich die Anzahl an zirkulierenden Makrophagen und somit auch die Anzahl in sekundären Lymphorganen im Vergleich zur Kontrolle erhöht, was in der vorliegenden Untersuchung allerdings nicht bestätigt werden konnte. Auch zwischen gestresster und nicht gestresster Gruppe fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass Makrophagen vor allem auf chemotaktische Signale reagieren und direkt zum Entzündungsort einwandern ohne vermehrt in Lymphknoten zu migrieren. Zu bedenken ist auch der Zeitpunkt der Immunisierung, da sowohl die nicht gestressten als auch die gestressten Tiere zum Zeitpunkt der Immunisierung noch keine Arthritis entwickelt hatten. Somit wäre zu einem späteren Zeitpunkt möglicherweise eine Veränderung zu beobachten. In einem weiteren Teilexperiment des Projektes, welches von Frau Dr. Christine Wolff durchgeführt wurde, zeigten sich an der Immunisierungsstelle der Tiere in der Schwanzhaut bei den nicht gestressten Tieren an Tag 4 und 14 signifikant höhere Anzahlen an Makrophagen im Vergleich zu den gestressten Tieren. Eine mögliche Erklärung dafür könnte ein Effekt von Katecholaminen sein, welche unter Stress ausgeschüttet werden und sich beispielsweise in einer verminderten Adhärenz von Granulozyten an Gefäßwände und damit verminderter Migration ins Gewebe manifestiert.<sup>119</sup> Die fehlende Veränderung im Lymphknoten könnte auch so interpretiert werden, dass keine Wanderung von Makrophagen aus der Schwanzhaut in sekundäre Lymphorgane stattfindet bzw. erst zu einem späteren Zeitpunkt.

### 5.3.2 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten stehen unter dem Verdacht, entscheidend zur Pathogenese der RA beizutragen; dies zeigt sich durch das Auftreten von Rheumafaktoren, Anti-CCP-Antikörpern und weiteren Autoantikörpern.<sup>38</sup> Darüber hinaus finden sich bei vielen Patienten Keimzentren, wie sie normalerweise in sekundären Lymphorganen auftreten; dies beweist die Beteiligung dieser Zellen am Krankheitsgeschehen.<sup>120</sup> Anzunehmen

wäre, dass sich durch das vermehrte Einwandern von B-Lymphozyten diese auch vermehrt im Lymphknoten finden ließen. In der vorliegenden Untersuchung konnte diese Vermutung allerdings nicht bestätigt werden; es fanden sich auch keine Unterschiede zwischen gestressten und nicht gestressten Tieren. Die absoluten Zahlen zeigten dagegen eine breite Streuung. Auch hier könnte eine quantitative Untersuchung der B-Lymphozyten im Bereich der Immunisierungsstelle in der Schwanzhaut im Vergleich zwischen gestressten und nicht gestressten Tieren Aufschluss darüber geben, ob psychosozialer Stress einen Einfluss auf die Verteilung und Wanderung von B-Lymphozyten nimmt. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass auch die B-Lymphozyten eine duale Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung einer RA spielen. So konnte gezeigt werden, dass B-Zellen über eine Aktivierung des CD40-Rezeptors zur Ausschüttung von IL-10 angeregt werden und damit eine Differenzierung von T-Zellen zu TH1-Zellen verhindern, was die Entwicklung einer RA am Tiermodell unterbindet.<sup>121</sup> Die Behandlung von Leukozyten mit Katecholaminen - also die Simulation einer Stresssituation - führt zu einer vermehrten IL-10-Produktion und damit zu einem TH2-Profil,<sup>91</sup> was die mögliche protektive Wirkung von akuten Stresssituationen - im Gegensatz zu chronischem Stress - deutlich macht. Zu bedenken ist auch hier wieder der Zeitpunkt der Immunisierung; möglicherweise könnten sich Unterschiede in der Anzahl von B-Lymphozyten im Lymphknoten zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt feststellen lassen.

### 5.3.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind sehr kompetente antigenpräsentierende Zellen, die vor allem durch die Aktivierung und konsekutive Differenzierung unreifer T-Lymphozyten eine wichtige Rolle in der Immunantwort einnehmen.<sup>122</sup> Ihre Reifung und Vermehrung wird unter anderem durch Zytokine reguliert; fördernd wirken dabei unter anderem IL-1 oder TNF.<sup>123</sup> Im Rahmen der RA werden derartige Zytokine vermehrt gebildet, weshalb ein Anstieg der dendritischen Zellen im Lymphknoten erwartet werden konnte. In der vorliegenden Untersuchung konnten allerdings keine quantitativen Unterschiede zwischen immunisierten und gesunden Tieren nachgewiesen werden, wobei natürlich auch stets der frühe Zeitpunkt der Untersuchung berücksichtigt werden muss.

Möglich wäre dass erst zu einem späteren Zeitpunkt Veränderungen beobachtet werden könnten, zumal sich beispielsweise Makrophagen im Verlauf einer Immunreaktion zu dendritischen Zellen umwandeln können und erst später quantitativ erfasst würden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, inwiefern sich die Population dendritischer Zellen im Bereich der Immunisierungsstelle in der Schwanzhaut verändert, da beispielsweise in einer Untersuchung durch Page und Mitarbeiter gezeigt werden konnte, dass beim Vergleich des Synovialgewebes mit Lymphknoten von RA-Patienten jeweils eine andere Differenzierungsstufe der dendritischen Zellen vorherrschend war, was darauf hinweist, dass dendritische Zellen stark durch das lokale Milieu beeinflusst werden. Somit wäre nicht nur ein quantitativer Vergleich interessant, sondern auch die Typisierung des Reifungsstadiums, um dadurch mögliche Konsequenzen für den Krankheitsverlauf abzuschätzen.<sup>124</sup>

Interessanterweise fand sich in der vorliegenden Untersuchung eine signifikante Verminderung der Anzahl an dendritischen Zellen bei gestressten Tieren im Vergleich zu den Tieren, die keinem psychosozialen Stress ausgesetzt waren. Eine Erklärung dafür könnte eine verminderte Wanderung von immunkompetenten Zellen aus der Haut in die sekundären Lymphorgane sein, welche möglicherweise durch die Wirkung von Katecholaminen auf die Gefäßwandadhäsion hervorgerufen wird.<sup>119</sup>

#### 5.3.4 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten stellen ebenfalls eine bedeutende Zellpopulation im entzündeten Synovialgewebe bei RA dar.<sup>125</sup> Obwohl die letztendliche Rolle der T-Lymphozyten im Entzündungsprozess noch nicht vollständig geklärt ist, lassen sich bei jeder Untersuchung von Synovialgewebe aktivierte T-Lymphozyten (vor allem CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten) identifizieren;<sup>126</sup> dies lässt somit Rückschlüsse auf die Krankheitsaktivität zu. Folglich ist eine vermehrte Anzahl von T-Lymphozyten in Lymphknoten zu erwarten, zumal hier die Proliferation der antigenspezifischen Zellen stattfindet. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit ein Anstieg der T-Lymphozyten bei den immunisierten Tieren im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren nachgewiesen werden. Wider Erwarten konnten allerdings keine Unterschiede in der T-Lymphozytenzahl zwischen gestressten und nicht gestressten Tieren festgestellt wer-

den, obwohl Glukokortikoide wie sie im Rahmen einer Stressreaktion gebildet werden, eigentlich einen suppressiven Effekt (beispielsweise über Hemmung von IL-2<sup>49+50</sup> und die Hemmung der Anigenpräsentation durch APCs)<sup>49</sup> auf die T-Lymphozyten ausüben müssten. Dies gilt vor allem wenn davon ausgegangen wird, dass es sich bei dem Stress, welchem die Versuchstiere ausgesetzt waren, um eine akute Stresssituation handelt, bei welcher es bisher nicht zu einer Gewöhnung gekommen ist. In diesem Zusammenhang war es interessant zu untersuchen ob sich bei den gestressten Tieren eine Veränderung des basalen Glukokortikoidlevels oder ein im Verhältnis zur Entzündung inadäquater Abfall bzw. fehlender Anstieg stattgefunden hat; in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe in Bayreuth fanden sich keine erhöhten Corticosteron-Spiegel im Blut der gestressten Tiere, wodurch sich womöglich die fehlende Suppression der T-Lymphozyten im Lymphknoten erklärt.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass sich lediglich für die T-Lymphozyten eine Erhöhung im sekundären Lymphorgan im Rahmen der Immunisierung finden ließ. Womöglich wären weitere Veränderungen bei den anderen immunkompetenten Zellen erst zu einem späteren Zeitpunkt zu beobachten gewesen, da die Manifestation der Arthritis zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht stattfand. Im Vergleich der Anzahl immunkompetenter Zellen zwischen gestressten und nicht gestressten Tieren zeigte sich lediglich bei den dendritischen Zellen ein Unterschied, der sich möglicherweise durch die gestörte Migration von immunkompetenten Zellen aus der Haut in sekundäre Lymphorgane unter psychosozialem Stress erklärt.



## **6 Zusammenfassung**

Die Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass auf die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie der RA eine Vielzahl verschiedener Faktoren Einfluss nimmt. Die Forschung der Neuroendokrinoimmunologie zeigte das Zusammenspiel des Nervensystems und des endokrinen Systems bzw. deren Einflüsse auf das Immunsystem auf und trug so viel zum Verständnis der Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis bei. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich an Hand eines antigenspezifischen Modells einer Arthritis, wie die durch Kollagen Typ II induzierte Arthritis, die pathophysiologischen Vorgänge gut nachvollziehen lassen. Dies zeigte sich in den klinischen und dazu korrelierenden histologischen Veränderungen. Des Weiteren konnte erneut gezeigt werden, dass es eindeutig zu Veränderungen des Nervensystems im lokalen Entzündungsmilieu kommt, was durch die Verminderung der sympathischen Nervenfasern im Entzündungsgebiet sowie der sich daraus ergebenden Veränderung des Gleichgewichts zwischen sympathischem und sensiblem Nervensystem deutlich wird. In vielen Voruntersuchungen wurde gezeigt, dass das sympathische Nervensystem durch eine komplexe Regulation zu verschiedenen Zeitpunkten des Entzündungsprozesses unterschiedliche Rollen hinsichtlich einer protektiven bzw. einer proinflammatorischen Wirkung einnimmt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der Entzündung mit der Abnahme sympathischer Nervenfasern korreliert. Dieser Mechanismus mag dazu dienen, eine Entzündung - beispielsweise im Rahmen der Bekämpfung eines bestimmten Agens - lokal begrenzt zu halten und die weitere Ausbreitung durch die antiinflammatorischen Effekte des sympathischen Nervensystems zu verhindern.

Im zweiten Teil der Arbeit konnten an Hand eines weiteren Arthritismodells ebenfalls Veränderungen des Nervensystems im Rahmen des Entzündungsprozesses beobachtet werden. Zusätzlich zeigte sich, dass bestimmte Konservierungsmethoden bei verschiedenen Nervenfaserklassen eine unterschiedliche Wirkung haben können. So zeigte sich für die Perfusionsmethode eine grundsätzlich höhere Anzahl an sympathischen Nervenfasern im Vergleich zu der Methode ohne Perfusion, wohingegen die Methode ohne Perfusion für die sensiblen Nervenfasern protektiver zu sein schien.

Der dritte Teil der Arbeit sollte dazu beitragen herauszufinden, inwiefern psychosozialer Stress auf die Initiierung einer Arthritis Einfluss nehmen kann. Die Untersuchung

zeigte, dass sich bei gestressten Tieren eine niedrigere Anzahl dendritischer Zellen im Lymphknoten finden ließ als bei nicht gestressten Tieren. Dies ist hinweisend darauf, dass psychosozialer Stress bereits in der Anfangsphase der Entwicklung einer chronischen Autoimmunerkrankung Einfluss nehmen kann. Dies korreliert mit den weiteren Ergebnissen der Arbeitsgruppe, die zeigen konnte, dass sich bei gestressten Tieren die Suszeptibilität für eine Arthritis reduzierte und eine verminderte Ausprägung der Arthritis auftrat. Weitere durch Stress hervorgerufene Einflüsse auf Migration und Anzahl immunkompetenter Zellen könnten möglicherweise in weiteren Untersuchungen mit längerer Beobachtungszeit nachgewiesen werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1.Stefan Laufer, Steffen Gay, Kay Brune: *Rheumatische Erkrankungen und Entzündungen. Von den molekularen Grundlagen zur medikamentösen Therapie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2002<sup>6</sup>
- 2.Dr. Med Thomas Hettenkofer (Herausgeber): *Rheumatologie Diagnostik Klinik Therapie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2003<sup>5</sup>
- 3.Kuipers und Zeidler in Zeidler, Zacher, Hiepe (Herausgeber): *Interdisziplinäre klinische Rheumatologie*. Springer Verlag 2008<sup>2</sup>
- 4.Mau W, Beyer W, Ehlebracht-König I, Engel M, Genth E, Greitemann B, Jäckel WH, Zink A (2008): *Burden of illness. First routine report on socio-medical consequences of inflammatory rheumatic disease in Germany*. Zeitschrift für Rheumatologie 67, 157-64
- 5.Lee H, Lee A, Criswell L, Seldin M, Amos C, Carulli J, Navarrete C, Remmers E, Kastner D, Plenge R, Li W, Gregersen P (2008): *Several Regions in the Major Histocompatibility Complex Confer Risk for Anti-CCP-Antibody Positive Rheumatoid Arthritis, Independent of the DRB1 Locus*. Journal of Molecular Medicine 14, 293-300
- 6.Lopez-Longo FJ, Sanchez-Ramon S, Carreno L (2009): *The value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: Do they imply new risk factors?* Drug News & Perspectives 22, 543-8
- 7.Schuerwegh AJ, Ioan-Facsinay A, Dorjée AL, Roos J, Bajema IM, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE (2010): *Evidence for a functional role of IgE anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 2586-91
- 8.Snir O, Widhe M, Hermansson M, von Spee C, Lindberg J, Hensen S, Lundberg K, Engström A, Venables P, Toes R, Holmdahl R, Klareskog L, Malmström V (2010): *Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients*. Arthritis & Rheumatism 62, 44-52.
- 9.Conrad K, Roggenbuck D, Reinhold D, Dörner T (2010): *Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies*. Autoimmunity Reviews 9, 431-5.
- 10.Koizumi F, Matsuno H, Wakaki K, Ishii Y, Kurashige Y, Nakamura H (1999): *Synovitis in rheumatoid arthritis: scoring of characteristic histopathological features*. Pathology International 49, 298-304
- 11.Soden M, Rooney M, Cullen A, Whelan A, Feighery C, Bresnihan B (1989): *Immunohistological features in the synovium obtained from clinically uninvolved knee joints of patients with rheumatoid arthritis*. British Journal of Rheumatology 28, 287-92
- 12.Sobotta J, Welsch U: *Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*. Elsevier GmbH München 2003<sup>1</sup>
- 13.Lüllmann-Rauch R: *Histologie. Verstehen-Lernen-Nachschlagen*. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 2003<sup>3</sup>
- 14.Karouzakis E, Neidhart M, Gay R, Gay S (2006): *Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction*. Immunology Letters 106, 8-13

15. Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B (1996): *Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism 39, 115-24
16. Qu Z, Garcia CH, O'Rourke LM, Planck SR, Kohli M, Rosenbaum JT (1994): *Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining*. Arthritis & Rheumatism 37, 212-20
17. Melnyk VO, Shipley GD, Sternfeld MD, Sherman L, Rosenbaum JT (1990): *Synoviocytes synthesize, bind, and respond to basic fibroblast growth factor*. Arthritis & Rheumatism 33, 493-500
18. Allen JB, Manthey CL, Hand AR, Ohura K, Ellingsworth L, Wahl SM: *Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta*. The Journal of Experimental Medicine 171, 231-47
19. Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ (1995): *Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium*. The Journal of Clinical Investigation 96, 1631-8.
20. Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR (1997): *Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 10895-900.
21. Perlman H, Liu H, Georganas C, Koch AE, Shamiyeh E, Haines GK 3rd, Pope RM (2001): *Differential expression pattern of the antiapoptotic proteins, Bcl-2 and FLIP, in experimental arthritis*. Arthritis & Rheumatism 44, 2899-908
22. Pap T, Cinski A, Baier A, Gay S, Meinecke I (2003): *Modulation of pathways regulating both the invasiveness and apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Joint Bone Spine 70, 477-9
23. Liu H, Eksarko P, Temkin V, Haines GK 3rd, Perlman H, Koch AE, Thimmapaya B, Pope RM (2005): *Mcl-1 is essential for the survival of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis*. The Journal of Immunology 175, 8337-45
24. Pope RM (2002): *Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis*. Nature Reviews Immunology 2, 527-35
25. Zhang HG, Huang N, Liu D, Bilbao L, Zhang X, Yang P, Zhou T, Curiel DT, Mountz JD (2000): *Gene therapy that inhibits nuclear translocation of nuclear factor- $\kappa$  B results in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis of human synovial fibroblasts*. Arthritis & Rheumatism 43, 1094-1105
26. Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, Gay S (1996): *Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice*. American Journal of Pathology 149, 1607-15
27. Keyszer G, Redlich A, Häupl T, Zacher J, Sparmann M, Engethüm U, Gay S, Burmester GR (1998): *Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry*. Arthritis & Rheumatism 41, 1378-87
28. Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S, Fernihough JK, Simmen B, Gay RE, Billingham M, Gay S (2000): *Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism 43, 1226-32

- 29.Korb A, Pavenstädt H, Pap T (2009): *Cell death in rheumatoid arthritis*. Apoptosis 14, 447-54
- 30.Lindhout E, van Eijk M, van Pel M, Lindeman J, Dinant HJ, de Groot C (1999): *Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients have intrinsic properties of follicular dendritic cells*. Journal of Immunology 162, 5949-56
- 31.Neidhart M, Zaucke F, von Knoch R, Jüngel A, Michel BA, Gay RE, Gay S (2005): *Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein*. Annals of the Rheumatic Diseases 64, 419-24
- 32.Rinaldi N, Weis D, Brado B, Schwarz-Eywill M, Lukoschek M, Pezzutto A, Keilholz U, Barth TF (1997): *Differential expression and functional behaviour of the alpha v and beta 3 integrin subunits in cytokine stimulated fibroblast-like cells derived from synovial tissue of rheumatoid arthritis and osteoarthritis in vitro*. Annals of the Rheumatic Diseases 56, 729-36
- 33.Lowin T, Straub RH, Neumann E, Bosserhoff A, Vogel C, Moissl C, Anders S, Müller-Ladner U, Schedel J. (2009): *Glucocorticoids increase alpha5 integrin expression and adhesion of synovial fibroblasts but inhibit ERK signaling, migration, and cartilage invasion*. Arthritis & Rheumatism 60, 3623-32
- 34.Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P, Simmen BR, Gay RE, Gay S (2000): *Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism 43, 2523-30
- 35.Redlich K, Hayer S, Ricci R, David JP, Tohidast-Akrad M, Kollias G, Steiner G, Smolen JS, Wagner EF, Schett G (2002): *Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction*. Journal of Clinical Investigation 110, 1419-27
- 36.Smeets TJ, Dolhain RJ, Breedveld FC, Tak PP (1998): *Analysis of the cellular infiltrates and expression of cytokines in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and reactive arthritis*. Journal of Pathology 186, 75-81
- 37.Firestein GS, Zvaifler NJ (1990): *How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?* Arthritis & Rheumatism 33, 768-73
- 38.Baeten D, Demetter P, Cuvelier C, Van Den Bosch F, Kruithof E, Van Damme N, Verbruggen G, Mielants H, Veys EM, De Keyser F (2000): *comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity*. Annals of the Rheumatic Diseases 59, 945-53
- 39.Girard JP, Springer TA (1995): *High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration*. Immunology Today 16, 449-57
- 40.Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B (1996): *Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism 39, 115-24
- 41.Franz JK, Kolb SA, Hummel KM, Lahrtz F, Neidhart M, Aicher WK, Pap T, Gay RE, Fontana A, Gay S. (1998): *Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis*. European Journal of Immunology 28, 2661-71
- 42.Vincenti MP, Coon CI, Brinckerhoff CE (1998): *Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts*. Arthritis & Rheumatism 41, 1987-94
- 43.Georganas C, Liu H, Perlman H, Hoffmann A, Thimmapaya B, Pope RM (2000): *Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial*

- fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun*. Journal of Immunology 165, 7199-206
44. Georg Löffler, Petro E. Petrides, Peter C. Heinrich: *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007<sup>8</sup>
  45. Saklatvala J. (1986): *Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage*. Nature 322, 547-9
  46. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR (1986): *Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors*. Nature 319, 516-8
  47. Keffer J, Probert L, Caziaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G (1991): *Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis*. The Embo Journal 10, 4025-4031
  48. Williams R, Feldmann M, Maini R (1992): *Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis*. Immunology 89, 9784-9788
  49. Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA (1986): *Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones*. Science 233, 652-4
  50. Rhen T, Cidlowski JA (2005): *Antiinflammatory action of glucocorticoids - new mechanisms for old drugs*. New England Journal of Medicine 353, 1711-23
  51. Webster J, Tonelli L, Sternberg E (2002): *Neuroendocrine regulation of immunity*. Annual Review of Immunology 20, 125-163
  52. Daynes RA, Araneo BA, Ershler WB, Maloney C, Li GZ, Ryu SY (1993): *Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative*. Journal of Immunology 150, 5219-30
  53. Straub R H, Konecna L, Hrach S, Rothe G, Kreutz M, Schölmerich J, Falk W, Lang B (1998): *Serum Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA Sulfate Are Negatively Correlated with Serum Interleukin-6 (IL-6), and DHEA Inhibits IL-6 Secretion from Mononuclear Cells in Man in Vitro: Possible Link between Endocrinosenescence and Immunosenescence*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 83, 2012-7
  54. Besedovsky HO, Rey AD (2007): *Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view*. Brain, Behaviour and Immunity 21, 34-44
  55. Williams JM, Felten DL (1981): *Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: a comparative histofluorescence study*. The Anatomical Record 199, 531-42
  56. Felten DL, Livnat S, Felten SY, Carlson SL, Bellinger DL, Yeh P (1986): *Sympathetic innervation of lymph nodes in mice*. Brain Research Bulletin 13, 693-9
  57. Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Da Prada M, Burri R, Honegger C (1983): *The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons*. Science 221, 564-6
  58. Sanders VM, Munson AE (1984): *Beta adrenoceptor mediation of the enhancing effect of norepinephrine on the murine primary antibody response in vitro*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 230, 183-92
  59. Sanders VM (2005): *2. Interdisciplinary research: noradrenergic regulation of adaptive immunity*. Brain, Behaviour and Immunity 20, 1-8
  60. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES (2000): *The sympathetic nerve - an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system*. Pharmacological Reviews 52, 595-638

- 61.Swanson MA, Lee WT, Sanders VM (2001): *IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine*. Journal of Immunology 166, 232-40
- 62.Straub RH, Cutolo M (2001): *Involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role*. Arthritis & Rheumatism 44, 493-507
- 63.Schubert D, LaCorbiere M, Klier FG, Steinbach JH (1980): *The modulation of neurotransmitter synthesis by steroid hormones and insulin*. Brain Research 190, 67-79
- 64.Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP (1998): *Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis*. Endocrine Reviews 19, 101-43.
- 65.Straub RH, Günzler C, Miller LE, Cutolo M, Schölmerich J, Schill S (2002): *Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro*. The FASEB Journal 16, 993-1000
- 66.Cash JM, Crofford LJ, Gallucci WT, Sternberg EM, Gold PW, Chrousos GP, Wilder RL (1992): *Pituitary-adrenal axis responsiveness to ovine corticotropin releasing hormone in patients with rheumatoid arthritis treated with low dose prednisone*. Journal of Rheumatology 19, 1692-6
- 67.Cutolo M, Foppiani L, Minuto F (2002): *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis impairment in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica*. Journal of Endocrinological Investigation 25, 19-23
- 68.Radikova Z, Rovinsky J, Vlcek M, Penesova A, Kerlik J, Vigas M, Imrich R (2008): *Adrenocortical response to low-dose ACTH test in female patients with rheumatoid arthritis*. Annals of the New York Academy of Sciences 1148, 562-6
- 69.Cutolo M, Villaggio B, Foppiani L, Briata M, Sulli A, Pizzorni C, Faelli F, Prete C, Felli L, Seriole B, Giusti M (2000): *The hypothalamic-pituitary-adrenal and gonadal axes in rheumatoid arthritis*. Annals of the New York Academy of Sciences 917, 835-43
- 70.Harbutz MS, Jessop DS (1999): *Is there a defect in cortisol production in rheumatoid arthritis?* Rheumatology (Oxford) 38, 298-302
- 71.Schmidt M, Weidler C, Naumann H, Anders S, Schölmerich J, Straub RH (2005): *Reduced capacity for the reactivation of glucocorticoids in rheumatoid arthritis synovial cells: possible role of the sympathetic nervous system?* Arthritis & Rheumatism 52, 1711-20
- 72.Hales DB (1992): *Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis primarily by decreasing 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450 expression*. Endocrinology 131, 2165-72
- 73.Macdiarmid F, Wang D, Duncan LJ, Purohit A, Ghilchick MW, Reed MJ (1994): *Stimulation of aromatase activity in breast fibroblasts by tumor necrosis factor alpha*. Molecular and Cellular Endocrinology 106, 17-21
- 74.Castagnetta LA, Carruba G, Granata OM, Stefano R, Miele M, Schmidt M, Cutolo M, Straub RH (2003): *Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis*. Journal of Rheumatology 30, 2597-2605
- 75.Hu SK, Mitcho YL, Rath NC (1988): *Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages*. International Journal of Immunopharmacology 10, 247-52

76. Khalkhali-Ellis Z, Seftor EA, Nieva DR, Handa RJ, Price RH Jr, Kirschmann DA, Baragi VM, Sharma RV, Bhalla RC, Moore TL, Hendrix MJ (2000): *Estrogen and progesterone regulation of human fibroblast-like synoviocyte function in vitro: implications in rheumatoid arthritis*. Journal of Rheumatology 27, 1622-31
77. Weidler C, Holzer C, Harbuz M, Hofbauer R, Angele P, Schölmerich J, Straub RH (2005): *Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium*. Annals of the Rheumatic Diseases 64, 13-20
78. Lorton D, Bellinger D, Duclos M, Felten SY, Felten DL (1996): *Application of 6-hydroxydopamine into the fatpads surrounding the draining lymph nodes exacerbates adjuvant-induced arthritis*. Journal of Neuroimmunology 64, 103-13
79. Härle P, Möbius D, Carr DJ, Schölmerich J, Straub RH (2005): *An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis*. Arthritis & Rheumatism 52, 1305-13
80. Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH (2000): *The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages*. The FASEB Journal 14, 2097-107
81. Straub RH, Cutolo M (2001): *Involvement of the hypothalamic--pituitary--adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role*. Arthritis & Rheumatism 44, 493-507
82. Garrett NE, Mapp PI, Cruwys SC, Kidd BL, Blake DR (1992): *Role of substance P in inflammatory arthritis*. Annals of the Rheumatic Diseases 51, 1014-8
83. Lotz M, Carson DA, Vaughan JH (1987): *Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis*. Science 235, 893-5
84. Lieb K, Fiebich BL, Berger M, Bauer J, Schulze-Osthoff K (1997): *The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells*. Journal of Immunology 159, 4952-8
85. Ruff MR, Wahl SM, Pert CB (1985): *Substance P receptor-mediated chemotaxis of human monocytes*. Peptides 6, 107-11
86. Levine JD, Clark R, Devor M, Helms C, Moskowitz MA, Basbaum AI (1984): *Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis*. Science 226, 547-9
87. Schaible HG, Grubb BD (1993): *Afferent and spinal mechanisms of joint pain*. Pain 55, 5-54
88. Feng Y, Tang Y, Guo J, Wang X (1997): *Inhibition of LPS-induced TNF-alpha production by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages*. Life Sciences 61, 281-7
89. Dirmeier M, Capellino S, Schubert T, Angele P, Anders S, Straub RH (2008): *Lower density of synovial nerve fibres positive for calcitonin gene-related peptide relative to substance P in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford) 47, 36-40
90. Padgett DA, Glaser R (2003): *How stress influences the immune response*. Trends in Immunology 24, 444-8



91. Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP (1996): *Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications*. Proceedings of the Association of American Physicians 108, 374-81
92. Calcagni E, Elenkov I (2006): *Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases*. Annals of the New York Academy of Sciences 1069, 62-76
93. Marshall GD Jr, Agarwal SK, Lloyd C, Cohen L, Henninger EM, Morris GJ (1998): *Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students*. Brain, Behaviour and Immunity 12, 297-307
94. Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM (1998): *An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease*. The Journal of Experimental Medicine 187, 537-46
95. Straub RH, Dhabar FS, Bijlsma J, Cutolo M (2005): *How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism 52, 16-26
96. Zautra AJ, Hoffman JM, Matt KS, Yocum D, Potter PT, Castro WL, Roth S (1998): *An examination of individual differences in the relationship between interpersonal stress and disease activity among women with rheumatoid arthritis*. Arthritis Care & Research 11, 271-9
97. Feigenbaum SL, Masi AT, Kaplan SB (1979): *Prognosis in rheumatoid arthritis. A longitudinal study of newly diagnosed younger adult patients*. American Journal of Medicine 66, 377-84
98. Herrmann M, Schölmerich J, Straub RH (2000): *Stress and rheumatic diseases*. Rheumatic Disease Clinics of North America 26, 737-63
99. Barber AE, Coyle SM, Marano MA, Fischer E, Calvano SE, Fong Y, Moldawer LL, Lowry SF (1993): *Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man*. Journal of Immunology 150, 1999-2006
100. Cutolo M, Villaggio B, Otsa K, Aakre O, Sulli A, Serio B (2005): *Altered circadian rhythms in rheumatoid arthritis patients play a role in the disease's symptoms*. Autoimmunity Reviews 4, 497-502
101. Neeck G, Federlin K, Graef V, Rusch D, Schmidt KL (1990): *Adrenal secretion of cortisol in patients with rheumatoid arthritis*. Journal of Rheumatology 17, 24-9
102. Chikanza IC, Petrou P, Kingsley G, Chrousos G, Panayi GS (1992): *Defective hypothalamic response to immune and inflammatory stimuli in patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism 35, 1281-8101
103. Straub RH, Kittner JM, Heijnen C, Schedlowski M, Schmidt RE, Jacobs R. (2002): *Infusion of epinephrine decreases serum levels of cortisol and 17-hydroxyprogesterone in patients with rheumatoid arthritis*. Journal of Rheumatology 29, 1659-64
104. Hall J, Morand EF, Medbak S, Zaman M, Perry L, Goulding NJ, Maddison PJ, O'Hare JP (1994): *Abnormal hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in rheumatoid arthritis. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs and water immersion*. Arthritis & Rheumatism 37, 1132-7

105. Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR (2004): *Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action*. Arthritis & Rheumatism 50, 3408-17
106. Schlaghecke R, Kornely E, Wollenhaupt J, Specker C (1992): *Glucocorticoid receptors in rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism 35, 740-4
107. Chikanza IC (2002): *Mechanisms of corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: a putative role for the corticosteroid receptor beta isoform*. Annals of the New York Academy of Science 966, 39-48
108. Cutolo M (1998): *The role of the hypothalamus-pituitary-adrenocortical and -gonadal axis in rheumatoid arthritis*. Clinical and Experimental Rheumatology 16, 3-6
109. Baerwald C, Graefe C, von Wichert P, Krause A (1992): *Decreased density of beta-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis*. Journal of Rheumatology 19, 204-10
110. Stefanski V, Ben-Eliyahu S. (1996): *Social confrontation and tumor metastasis in rats: defeat and beta-adrenergic mechanisms*. Physiology & Behaviour 60, 277-82
111. Straub RH, Paimela L, Peltomaa R, Schölmerich J, Leirisalo-Repo M (2002): *Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to interleukin-6 and tumor necrosis factor in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis*. Arthritis & Rheumatism 46, 654-62
112. del Rey A, Wolff C, Wildmann J, Randolph A, Hahnel A, Besedovsky HO, Straub RH (2008): *Disrupted brain-immune system-joint communication during experimental arthritis*. Arthritis & Rheumatism 58, 3090-9
113. Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, Häupl T (2005): *Synovialitis score: histopathological grading system for chronic rheumatic and non-rheumatic synovialitis*. Zeitung für Rheumatologie 64, 334-42
114. Matsuno H, Yudoh K, Nakazawa F, Koizumi F (2002): *Relationship between histological findings and clinical findings in rheumatoid arthritis*. Pathology International 52, 527-33
115. Straub RH (2007): *Autoimmune disease and innervation*. Brain, Behaviour and Immunity 21, 528-34
116. Shirvan A, Ziv I, Fleminger G, Shina R, He Z, Brudo I, Melamed E, Barzilai A (1999): *Semaphorins as mediators of neuronal apoptosis*. Journal of Neurochemistry 73, 961-71
117. Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Schölmerich J, Straub RH (2004): *Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism 50, 1156-63
118. Straub RH, Mayer M, Kreutz M, Leeb S, Schölmerich J, Falk W (2000): *Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes*. Journal of Leukocyte Biology 67, 553-8
119. Boxer LA, Allen JM, Baehner RL (1980): *Diminished polymorphonuclear leukocyte adherence. Function dependent on release of cyclic AMP by endothelial cells after stimulation of beta-receptors by epinephrine*. Journal of Clinical Investigation 66, 268-74
120. Takemura S, Braun A, Crowson C, Kurtin PJ, Cofield RH, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand CM (2001): *Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis*. Journal of Immunology 15, 1072-80

121. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M (2003): *Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells*. Journal of Experimental Medicine 197, 498-501
122. Steinman RM, Banchereau J (2007): *Taking dendritic cells into medicine*. Nature 449, 419-26
123. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J (1997): *CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis*. Blood 90, 1458-70
124. Page G, Lebecque S, Miossec P: (2002): *Anatomic localization of immature and mature dendritic cells in an ectopic lymphoid organ: correlation with selective chemokine expression in rheumatoid synovium*. Journal of Immunology 168, 5333-41
125. Gay S, Gay RE, Koopman WJ (1993): *Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction?* Annals of the Rheumatic Diseases 52, 39-47
126. Kotzin BL, Kappler J (1998): *Targeting the T cell receptor in rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism 41, 1906-10

## **8 Danksagung**

Für die freundliche Überlassung des Themas und die großzügige Bereitstellung der Arbeitsmittel und des biologischen Labors der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Universität Regensburg möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Rainer H. Straub sehr herzlich danken.

Frau Dr. Christine Wolff gebührt mein besonderer Dank für die Übernahme der Betreuung der Dissertationsarbeit sowie ihr großes Engagement und die äußerst freundschaftliche Zusammenarbeit während der Durchführung der Versuche sowie viele wertvolle Ratschläge und die Einweisung in die Bedienung des Fluoreszenzmikroskops.

Allen anderen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, die mich bei der Durchführung dieser Dissertationsarbeit unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken; insbesondere danke ich Frau Dr. Silvia Capellino und Frau Luise Rauch für zahlreiche nützliche Ratschläge.

Nicht zuletzt danke ich meinen lieben Eltern, auf deren Unterstützung ich in jeder erdenklichen Hinsicht zählen kann und meinem Bruder, welcher mir stets mit Rat und Tat zur Seite steht.

## **9 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Anja Gabriele Hahnel  
Geburtsdatum: 28. April.1985  
Geburtsort: Amberg  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

09/1991 – 08/1995: Grundschule Kümmersbruck  
09/1995 – 05/2004: Gregor-Mendel-Gymnasium Amberg; Allgemeine Hochschulreife

### **Studium**

10/2004 – 08/2006: Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg (vorklinischer Abschnitt)  
09/2006: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/2006: Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg (klinischer Abschnitt)  
10/2010: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
12/2010: Approbation als Ärztin

### **Berufstätigkeit**

seit 01/2011: Wissenschaftliche Assistentin an der Universitätsklinik Regensburg (Innere Medizin I)

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht worden.

Regensburg, September 2011

Anja Hahnel

## **11 Zugrunde liegende Publikation**

### **Disrupted Brain–Immune System–Joint Communication During Experimental Arthritis**

Adriana del Rey, Christine Wolff, Johannes Wildmann, Anke Randolph, Anja Hahnel, Hugo O. Besedovsky and Rainer H. Straub

ARTHRITIS & RHEUMATISM  
Vol. 58, No. 10, October 2008, pp 3090–3099

# Disrupted Brain–Immune System–Joint Communication During Experimental Arthritis

Adriana del Rey,<sup>1</sup> Christine Wolff,<sup>2</sup> Johannes Wildmann,<sup>1</sup> Anke Randolph,<sup>1</sup> Anja Hahnel,<sup>2</sup>  
Hugo O. Besedovsky,<sup>1</sup> and Rainer H. Straub<sup>2</sup>

**Objective.** To explore the hypothesis that, in parallel with alterations in the hypothalamus–pituitary–adrenal axis and the sympathetic nervous system, hypothalamic cytokine expression and monoaminergic neurotransmitter concentrations are affected during the course of arthritis development induced by type II collagen. This hypothesis was based on evidence that acute inflammatory processes induce cytokine expression in the brain and affect neuronal activity. We also studied whether depletion of hypothalamic noradrenaline can affect peripheral joint disease.

**Methods.** Hypothalamic cytokine gene expression and neurotransmitter concentration, parameters of inflammation, and joint innervation were evaluated during arthritis development in rats induced by injection of type II collagen in Freund's incomplete adjuvant. Noradrenergic neurons in the brain were depleted with 6-hydroxydopamine.

**Results.** Transiently increased corticosterone levels, followed by increased adrenaline levels and hypothalamic interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-6 overexpression were observed only during the induction phase of the disease. Hypothalamic noradrenaline content was increased during the symptomatic phase and was paralleled by a gradual loss of noradrenergic fibers in the joints. The positive correlation between hypothalamic

IL-1 $\beta$  expression and noradrenaline content in control groups was not observed in rats in which arthritis developed. Depletion of hypothalamic noradrenergic neurons when arthritis was established did not affect the course of the disease.

**Conclusion.** The dissociation between hypothalamic cytokine gene expression and noradrenergic neuronal activity, the lack of sustained stimulation of the stress axes, and the loss of sympathetic signals in the joints indicate a disruption in communication between afferent immune messages to the central nervous system and 2 main efferent antiinflammatory pathways under control of the brain during collagen-induced arthritis.

The inflammatory/autoimmune process observed during experimentally induced arthritis is paralleled by neuroendocrine alterations, particularly in the activity of the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis and the sympathetic nervous system (SNS) (for review, see refs. 1–3). The inflammatory component of the disease can be modulated at the level of the joints by efferent peripheral nerves (2,4–6), and the SNS seems to exert a proinflammatory influence during the induction, asymptomatic phase but an antiinflammatory effect in the late symptomatic phase of type II collagen-induced arthritis (2). Interestingly, sympathetic innervation is largely decreased in advanced stages of type II collagen-induced arthritis in mice, so that the antiinflammatory influence of sympathetic nerve fibers might be missing during the symptomatic phase (2). Similar findings have been reported in patients with rheumatoid arthritis (RA) (7), a condition that is additionally complicated by low levels of endogenous cortisol (8). Both alterations suggest a disruption in communication between the central nervous system (CNS) and the periphery.

In contrast, the effect of cytokines produced during the disease might not be restricted to local actions in inflamed tissues (9,10), and afferent pathways

Supported by the German Research Council (grants DFG RE 1452/2-2 and DFG STR 511/15-1).

<sup>1</sup>Adriana del Rey, PhD, Johannes Wildmann, PhD, Anke Randolph, PhD, Hugo O. Besedovsky, MD: Institute of Physiology and Pathophysiology, University of Marburg, Marburg, Germany; <sup>2</sup>Christine Wolff, MS, Anja Hahnel, Medical Student, Rainer H. Straub, MD: Internal Medicine I, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany.

Dr. del Rey and Ms Wolff contributed equally to this work.

Address correspondence and reprint requests to Hugo O. Besedovsky, MD, Department of Immunophysiology, Institute of Physiology and Pathophysiology, Deutschhausstrasse 2, 35037 Marburg, Germany. E-mail: besedovs@mail.uni-marburg.de.

Submitted for publication September 28, 2007; accepted in revised form June 6, 2008.



mediated by immune products might influence the CNS. Indeed, there is clear evidence of the existence of bidirectional immune–neuroendocrine system interactions (for review, see refs. 11–13). Studies performed under acute conditions (e.g., following lipopolysaccharide injection) have shown that cytokines can affect hormone production and can influence brain functions by altering the activity of defined neurons in the CNS and the release and turnover rate of neurotransmitters. In turn, these changes can elicit neuroendocrine host responses capable of affecting immune cells and the course of inflammatory/autoimmune diseases (for review, see refs. 11–14). Humoral and neural routes have been proposed as pathways by which cytokines can affect the CNS (for review, see refs. 11 and 15–17). Still another way by which immune mediators produced in the periphery can affect brain functions is by inducing cytokine production in the brain itself, since even mild peripheral immune stimulation results in the biologically significant expression of brain-borne proinflammatory cytokines (18,19). These findings suggest that effects such as those observed during acute conditions could also occur in chronic inflammatory diseases. Thus, the CNS might play an important role during the asymptomatic and symptomatic phases of arthritis.

We hypothesized that the peripheral immune/inflammatory response during arthritis can affect the cytokine and monoamine content in the brain in parallel with blood levels of important stress hormones. To explore this possibility, we evaluated gene expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), and IL-6, the concentrations of catecholamines and indolamines and their precursors and metabolites in the hypothalamus, and the levels of corticosterone, adrenaline, and noradrenaline (NA) in blood during experimental arthritis induced by type II collagen, a model of arthritis with several features that resemble RA (20). The density of noradrenergic fibers in the joints during the development of the disease was evaluated in parallel. In addition, based on previous observations in mice and in patients that sympathetic innervation is markedly decreased in the affected joints, we tested the hypothesis that experimental depletion of hypothalamic NA during the symptomatic phase would not influence type II collagen-induced arthritis because of disruption of the brain–SNS axis.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Female dark agouti (DA) rats ages 6–8 weeks and weighing 150–200 gm were purchased from Harlan

Winkelmann (Borchen, Germany). Rats were housed 5 per cage and were allowed to habituate to the animal laboratory conditions for 2 weeks before the experiments were started. Animals were fed standard laboratory chow and water ad libitum under standard conditions and were maintained under 12-hour cycles of light and dark. Experiments were conducted according to institutional and governmental regulations for animal use (Government of the Oberpfalz AZ 621-2531.1-09/04).

**Collagen arthritis model.** On day 0, rats received 300  $\mu$ g of bovine type II collagen (CII; Chondrex, Seattle, WA) emulsified in an equal volume of Freund's incomplete adjuvant (IFA; Sigma, Deisenhofen, Germany), which was injected intradermally at the base of the tail. The following controls were included simultaneously: one group received CII only, another received IFA only, and a third group received 0.9% NaCl only. Each limb was scored separately for signs of arthritis. One point was assigned for each of the following 3 inflamed regions: digits, middle regions, and ankle joints of the front and hind paws. One additional point was given for limping on each extremity. Thus, a maximum arthritis score of 4 points per extremity and 16 points per animal could be assigned.

**Immunohistochemistry and quantification of nerve fibers.** Immediately after killing the rats by decapitation on day 14, 28, 41, or 55, the extremities were harvested and fixed in 4% formalin, washed in phosphate buffered saline (PBS), and decalcified in RDO Rapid Decalcifier (Apex Engineering Products, Aurora, IL). The extremities were then washed again with PBS and incubated for 24 hours in 20% sucrose in PBS. The tissue was embedded in protective freezing medium (Tissue-Tek; Sakura, Zoeterwoude, The Netherlands) and quick-frozen in liquid nitrogen for nerve fiber staining and standard hematoxylin and eosin (H&E) staining. Frozen sections were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used.

Samples were cut into 10- $\mu$ m-thick sections for H&E staining and 12- $\mu$ m-thick sections for nerve fiber staining. Cryosections were immunostained with primary antibodies against tyrosine hydroxylase (Chemicon, Temecula, CA), the key enzyme of NA synthesis in sympathetic nerve endings, according to the protocol described elsewhere (7). The numbers of stained nerve fibers with a minimum length of 50  $\mu$ m (indicated by a small-micrometer eyepiece) were counted in selected fields at 400 $\times$  magnification, as recently described (2). At least 4 rats were examined at each time point. In each rat, 5 rectangular joint regions of the extremities were selected in such a way that the digits, middle regions, and ankle joints of the front and hind paws and the respective synovial tissue were included. Results are expressed per square millimeter of tissue.

**Ex vivo evaluation of peripheral cytokines.** Groups of rats were killed by decapitation on day 0, 5, 14, 28, 41, or 55 after injection. The draining lymph nodes in the inguinal region were dissected, and cell suspensions were prepared in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin, 2  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (complete RPMI; all from Sigma). Cells were counted, and viability was determined by trypan blue exclusion. Cells ( $2 \times 10^5$ /well) were incubated in 96-well plates with or without 5  $\mu$ g/ml of concanavalin A (grade IV; Sigma). Three days later, plates were centrifuged, and the supernatants were collected and analyzed for IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF $\alpha$ , and interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) con-

centrations by Luminex Multiplex Detection technology using Beadlyte reagents (LincoPlex; Linco Research, St. Charles, MO).

**RNA extraction, reverse transcription (RT), real-time polymerase chain reaction (PCR), and relative quantification of PCR products.** Total RNA extraction and RT were performed as previously described (21). Real-time PCR was performed in a volume of 25  $\mu$ l with the MX 3000P System (Stratagene, Heidelberg, Germany). PCR reagents and conditions were also as previously described (21). Primer and fluorogenic probes were designed using the automated primer analysis software, Primer Express (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) or have been already published. The primers and probes used were as follows: for IL-1 $\beta$ , those described in ref. 21; for IL-6, GACAGTGCATCATCGCTGTTTCATA (forward primer), AGTCGGAGGCTTAATTACATATGTTC (reverse primer), and CAGAATTGCCATTGCAC AACTCTTTTCTCATTT (probe) (accession no. NM\_012589); for TNF $\alpha$ , those described elsewhere (22); and for the normalizer rpL32, those described previously (23). The comparative threshold cycle ( $C_t$ ) method ( $\Delta\Delta C_t$  method), as previously described (24), was used to calculate relative gene expression data, since we determined in preliminary experiments that the amplification efficiencies of the target genes and the reference gene (rpL32) are approximately the same. Thus, cytokine messenger RNA (mRNA) levels were normalized to the rpL32 in each sample. The value in saline-injected rats was arbitrarily set at 1.0.

**Determination of brain neurotransmitters, blood catecholamines, and corticosterone.** Concentrations of catecholamine and catecholamine precursor and metabolites were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) as previously described (25). Blood plasma samples underwent a purification step using alumina adsorption prior to HPLC determination. Peaks were quantified by peak height evaluation using evaluation software (Chromeleon version 6.01; Dionex, Sunnyvale, CA). Plasma levels of corticosterone were determined by radioimmunoassay as previously described (26).

**Depletion of noradrenergic neurons in the brain.** Rats were injected with CII suspended in IFA as described above. Twenty-five days later, central catecholamines were depleted by stereotactic injection of 100  $\mu$ g of freshly prepared 6-hydroxydopamine (6-OHDA; Sigma) dissolved in 10  $\mu$ l of isoascorbate solution as vehicle (2 mg/ml of isoascorbic acid in sterile saline solution) into the lateral ventricles (5  $\mu$ l/ventricle). Control rats received vehicle alone. The stereotactic coordinates were +1.5 mm lateral and -4.0 mm ventral to the bregma.

**Statistical analysis.** Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Fisher's protected least significant difference test for multiple comparisons. *P* values less than 0.05 were considered significant.

## RESULTS

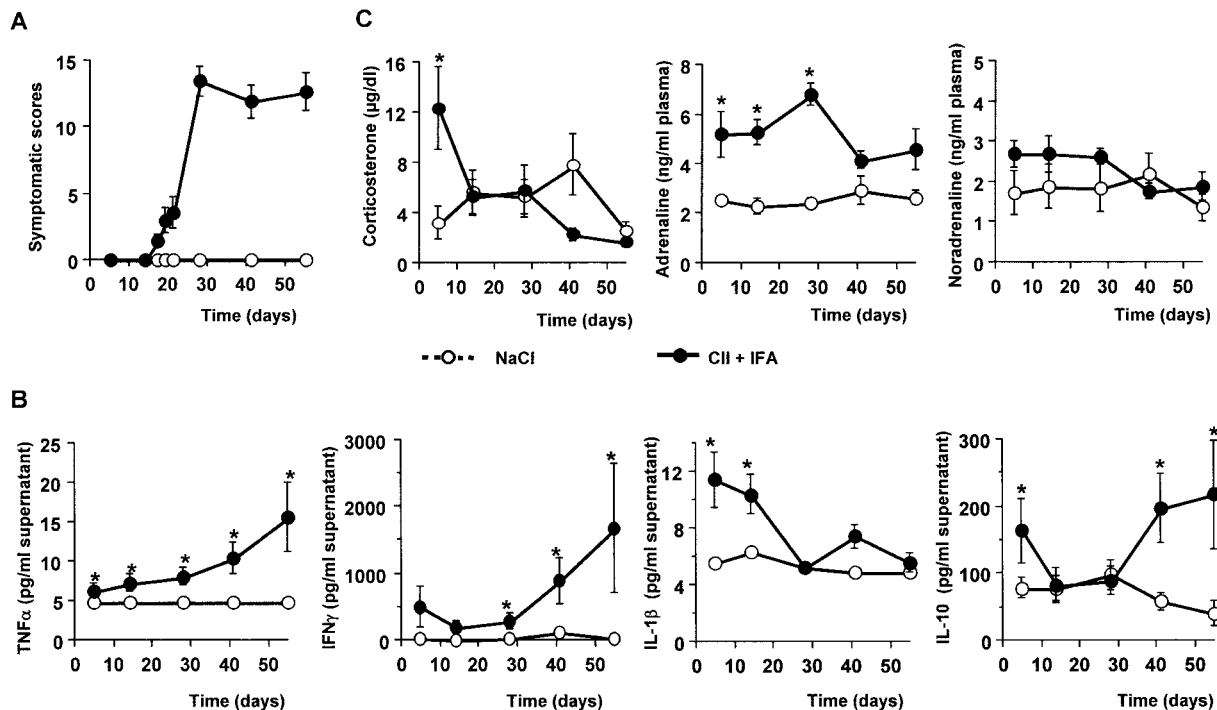
**Arthritis scores and levels of inflammation during arthritis.** The arthritis scores and the ex vivo production of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and the antiinflamma-

tory cytokine IL-10 by cells from draining lymph nodes are shown in Figures 1A and B. Only rats in the group that received CII plus IFA developed clinical symptoms of arthritis, which were first detected on day 17 after immunization (Figure 1A).

Plasma levels of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-10 were below the detection limit of the assay in all 4 groups of rats and at all time points studied. Plasma levels of IFN $\gamma$  and IL-6 that were within the measurable range did not differ between groups at any time point (data not shown).

The spontaneous ex vivo production of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  increased progressively in all rats in the CII plus IFA group from day 5 after immunization until the end of the study (day 55 after immunization), whereas IL-1 $\beta$  production was maximally increased before the signs of disease were manifested and then sharply declined with the appearance of the first symptoms (Figure 1B). IL-6 concentrations were below the detection limit of the assay (5 pg/ml) in all 4 experimental groups and at all time points studied. In vitro IL-10 production was transiently enhanced on day 5, but the increase was sustained at a relatively late phase of arthritis (Figure 1B). No changes in the production of any of the cytokines by cells obtained from rats in the 3 control groups (injected with physiologic saline, CII, or IFA alone) were detected (data not shown). A strong increase in the production of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  was detected when draining lymph node cells were stimulated in vitro with concanavalin A (data not shown). However, the concentrations reached were similar in all groups at all time points studied, indicating that the strong mitogenic stimulation masked the differences in the capacity of lymphoid cells to produce cytokines spontaneously.

**Blood levels of corticosterone, adrenaline, and noradrenaline during the course of arthritis.** An ~3–4-fold increase in corticosterone blood levels was observed in rats immunized with CII plus IFA (Figure 1C). This change was no longer detectable on day 14, and the levels of the hormone decreased thereafter. In the interval between 41 days and 55 days, blood levels of corticosterone were significantly lower in rats that received CII plus IFA than in rats that received IFA alone (mean  $\pm$  SEM 2.38  $\pm$  0.52  $\mu$ g/dl of plasma [*n* = 12] versus 9.23  $\pm$  1.63  $\mu$ g/dl of plasma [*n* = 17]; *P* < 0.0003). While a small increase in the blood levels of NA was detected in the CII plus IFA group in the interval between 5 days and 28 days after immunization, blood levels of adrenaline were 2–3 times higher than those in the saline-injected group during the same period (Figure 1C). No significant changes in the levels of catecholamines were observed in the other groups.



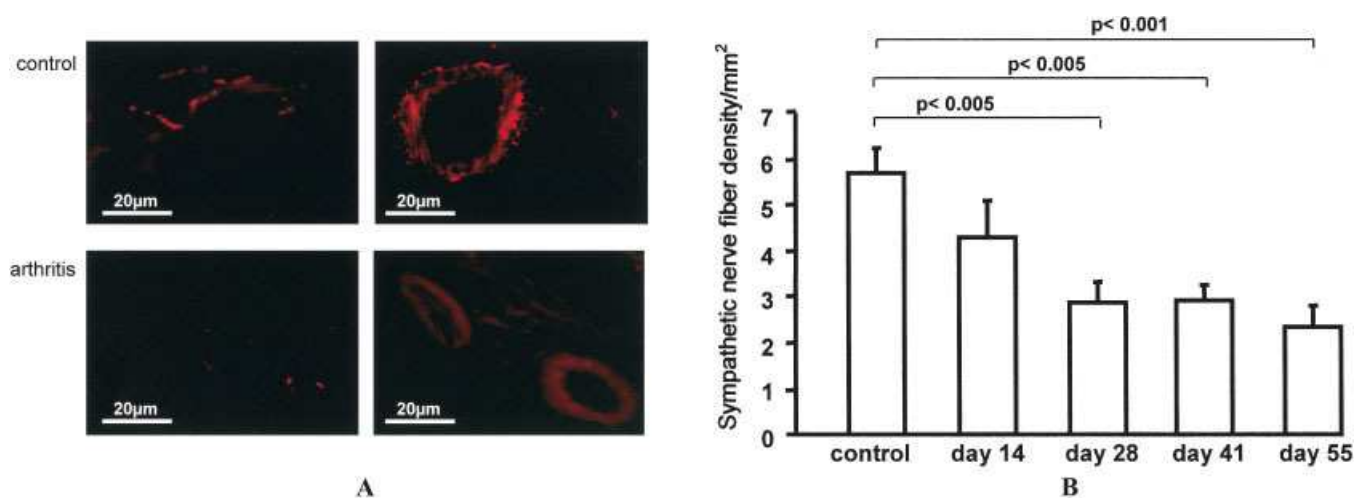
**Figure 1.** Symptomatic arthritis scores, in vitro cytokine production, and hormone levels in the blood of rats with collagen-induced arthritis assessed on days 0, 5, 14, 28, 41, and 55 after injection. **A**, Arthritis symptoms in rats immunized with bovine type II collagen (CII) emulsified in Freund's incomplete adjuvant (IFA) and in saline-injected controls. Arthritis symptoms were scored as described in Materials and Methods (maximum score 16 per rat). For the sake of simplicity, only the results obtained in immunized rats and in control rats injected with an equivalent volume of NaCl are illustrated. **B**, Cytokine concentrations in immunized rats and controls. After arthritis scores were recorded, groups of 7–9 rats per experimental group and time point were killed, and lymphoid cells from the local lymph nodes were cultured for 72 hours. Concentrations of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and IL-10 in the culture supernatants were determined. **C**, Plasma hormone levels in immunized rats and controls. Concentrations of corticosterone, adrenaline, and noradrenaline in plasma obtained from the same rats at the time of killing were determined. Values are the mean  $\pm$  SEM of 7–9 rats per group per time point. \* =  $P < 0.05$  versus NaCl controls.

**Disappearance of noradrenergic nerve fibers from affected joints during arthritis.** As previously reported in studies of humans and mice, tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme for NA synthesis that is commonly used to trace noradrenergic fibers, was barely detectable in the inflamed joints of rats in which type II collagen arthritis was induced. Figure 2A shows representative photomicrographs of an affected joint and a normal joint. In a detailed quantification analysis, we observed that the decreasing density of sympathetic nerve fibers had already begun by day 14 (Figure 2B), although the difference was not statistically significant. However, on day 28 and throughout the entire study until day 55, the density of sympathetic nerve fibers in the inflamed joints was markedly decreased as compared with that in control rats (Figure 2B). Thus, a significant reduction in the density of sympathetic nerve fibers was

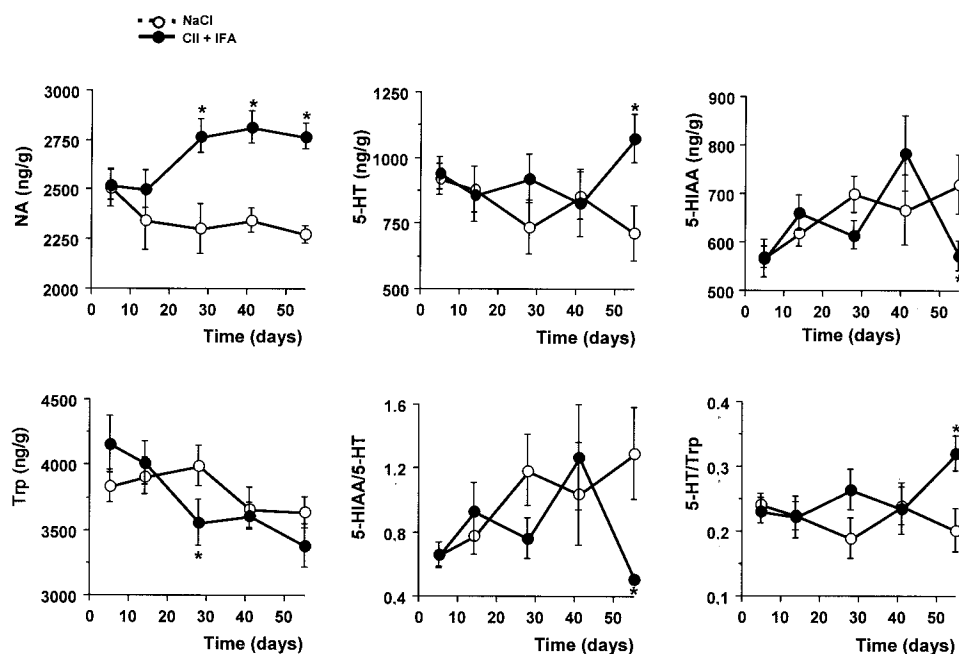
observed shortly after the appearance of symptomatic arthritis (compare Figures 1A and 2B).

**Changes in the concentrations of neurotransmitters and their precursors and metabolites in the CNS during arthritis development.** Levels of the monoaminergic neurotransmitters NA, dopamine, and serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]), its aromatic amino acid precursor tryptophan (Trp), and their main metabolites 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol (MHPG), dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), respectively, were determined in the hypothalamus during the development and expression of CII-induced arthritis in rats immunized with CII plus IFA, as well as in the 3 control groups.

The most remarkable change detected was an increase in the hypothalamic content of NA in the experimental group (CII plus IFA) as compared with the

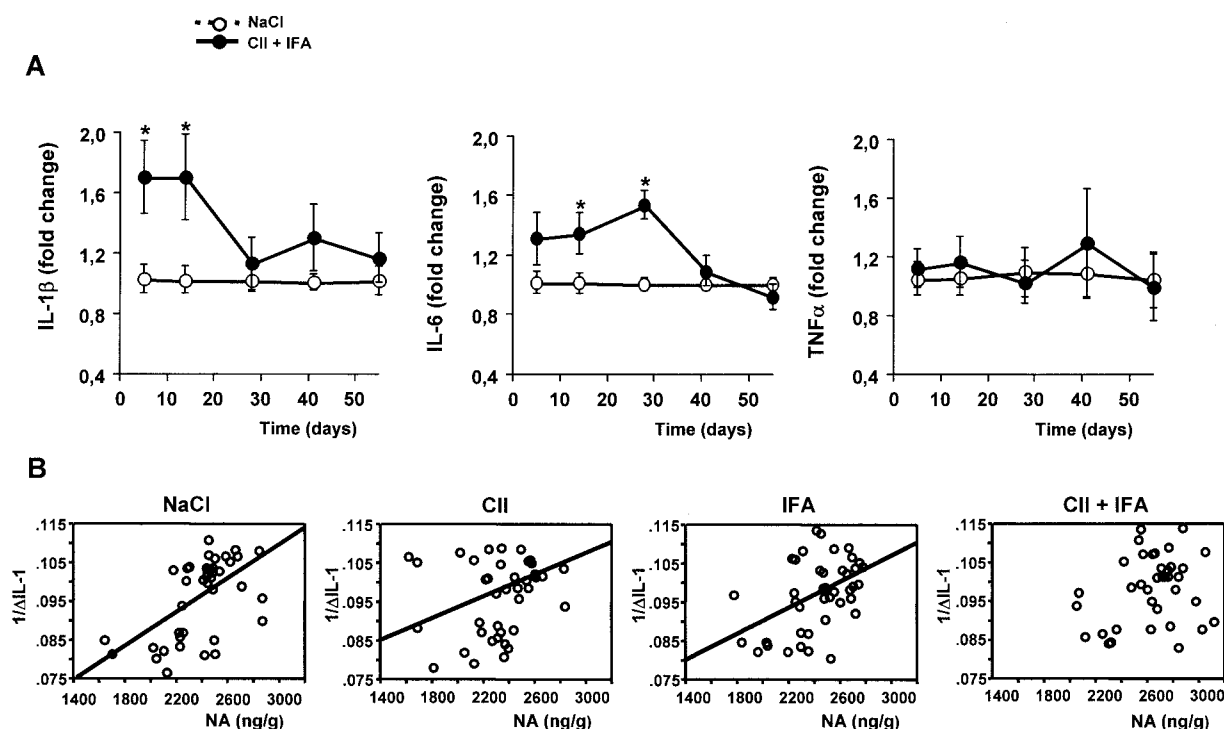


**Figure 2.** Decreased sympathetic nerve fibers in the proximity of arthritic joints. Animals were killed on day 14, 28, 41, or 55 after injection of saline (control) or after immunization with bovine type II collagen emulsified in Freund's incomplete adjuvant (arthritic), and the joints were removed for processing. Sympathetic nerve fibers were stained using an antibody against tyrosine hydroxylase, the key enzyme of catecholamine production. **A**, Loss of sympathetic nerve fibers in the joint. Shown are nerve fibers in the joint of a control rat (top) and an arthritic rat (bottom), showing areas without vessels (left) and areas with vessels in close proximity to the joint (right). (Original magnification  $\times 400$ .) **B**, Quantification of nerve fiber density in control and arthritic joints. A total of 18–21 joint regions in at least 4 rats per time point were investigated in arthritic joints, and 46 joint regions in 10 rats were investigated in control joints. Values are the mean and SEM nerve fiber density per mm<sup>2</sup>.



**Figure 3.** Concentrations of neurotransmitters, their precursors, and their metabolites in the hypothalamus during the development of arthritis. Rats were immunized with bovine type II collagen (CII) emulsified in Freund's incomplete adjuvant (IFA) or with saline (controls). The hypothalamus from the same rats used in Figure 1 was dissected at the time of killing, divided into 2 parts, and immediately frozen. The right part of the hypothalamus was used for determinations of the neurotransmitters noradrenaline (NA), serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]), the serotonin precursor tryptophan (Trp), and its main metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), as well as the ratios of 5-HIAA to 5-HT and 5-HT to tryptophan. Values are the mean  $\pm$  SEM of 7–9 rats per group per time point. \* =  $P < 0.05$  versus NaCl controls.



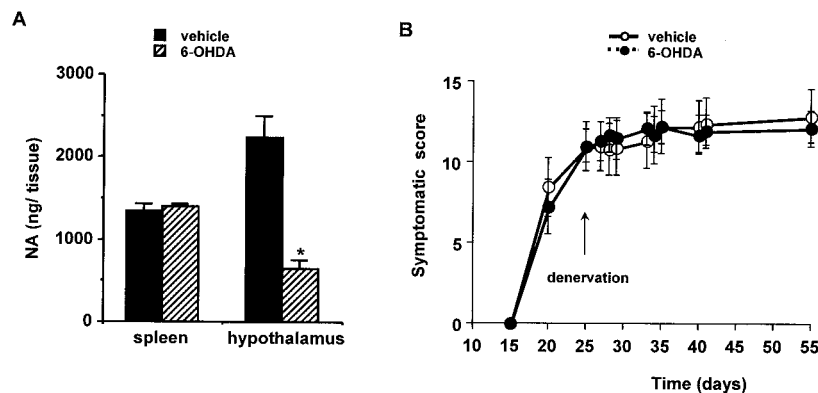


**Figure 4.** Cytokine gene expression in the hypothalamus during the development of arthritis. Rats were immunized with bovine type II collagen (CII) emulsified in Freund's incomplete adjuvant (IFA) or with saline (controls). **A**, Expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) in the hypothalamus. The hypothalamus from the same rats used in Figure 1 was dissected at the time of killing, divided into 2 parts, and immediately frozen. The left part of the hypothalamus was used to evaluate IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF $\alpha$  gene expression. Values are the mean  $\pm$  SEM of 7–9 rats per group per time point. \* =  $P < 0.05$  versus NaCl controls. **B**, Noradrenaline (NA) concentrations in the right hypothalamus and IL-1 $\beta$  gene expression in the left hypothalamus in individual rats in the 4 experimental groups: physiologic saline (NaCl;  $n = 43$ ), CII ( $n = 40$ ), IFA ( $n = 41$ ), and CII plus IFA ( $n = 40$ ). Expression of the IL-1 $\beta$  gene is presented as the inverse of the minimal number of cycles needed to detect it; higher values indicate higher expression. The corresponding  $R^2$  and  $P$  values were as follows:  $R^2 = 0.338$ ,  $P < 0.0001$  for the NaCl controls;  $R^2 = 0.116$ ,  $P < 0.03$  for the CII controls;  $R^2 = 0.217$ ,  $P < 0.002$  for the IFA controls; and  $R^2 = 0.026$ ,  $P = 0.317$  for the CII plus IFA arthritic rats, as determined by regression analysis using StatView software (version 5.0).

control groups (Figure 3). This effect occurred coincident with the overt expression of arthritis. Increased 5-HT content, which was paralleled by a decrease in the levels of its metabolite 5-HIAA, was noticed on day 55 after immunization (Figure 3). Such changes resulted in a reduced ratio of 5-HIAA to 5-HT. A comparable effect was observed on day 28 after immunization. No changes in these parameters were observed in rats injected with IFA or CII alone, as compared with rats that received only physiologic saline. A significant decrease in Trp concentrations was detected in the CII plus IFA-immunized rats on day 28 only, and the ratio of 5-HT to Trp was significantly increased on day 55 (Figure 3). No statistically significant changes were detected in the level of MHPG, the ratio of MHPG to

NA, the level of dopamine, the level of DOPAC, and the ratio of DOPAC to dopamine (data not shown).

**Cytokine gene expression in the hypothalamus during the development of arthritis.** Quantification of cytokine transcripts in the hypothalamus at different stages of arthritis development showed that IL-1 $\beta$  gene expression was significantly increased on days 5 and 14 after immunization only in rats immunized with CII plus IFA (Figure 4A). This increase was no longer noted after the clinical onset of arthritis. Increased IL-6 gene expression also occurred in rats in the CII plus IFA group only, but the effect was observed until day 28 after immunization. Also in this case, IL-6 mRNA levels returned to the range of those in the control rats at later stages of the disease (days 41 and 55 after immunization)



**Figure 5.** No effect of brain noradrenaline (NA) neuron depletion on disease severity when arthritis symptoms are clearly manifested. Groups of rats were immunized with bovine type II collagen emulsified in Freund's incomplete adjuvant. Twenty-five days later, when all rats showed symptoms of arthritis, 6-hydroxydopamine (6-OHDA;  $n = 10$ ) or isoascorbic acid vehicle alone ( $n = 9$ ) was injected intracerebroventricularly. Arthritis severity was recorded daily until day 55, when rats were killed, and the spleen and hypothalamus were collected. Symptoms of arthritis were evaluated as described in Materials and Methods (maximum score 16 per rat). **A**, NA concentrations in the hypothalamus and spleen. \* =  $P < 0.0001$  versus vehicle. **B**, Symptomatic arthritis scores. Values are the mean  $\pm$  SEM.

(Figure 4A). No significant changes in  $\text{TNF}\alpha$  gene expression were detected at any of the time points studied (Figure 4A).

In Figure 4A, the changes in cytokine gene expression are expressed as the fold change from the values obtained in the hypothalamus of rats injected with physiologic saline. The inverse of the minimal numbers of cycles needed to detect the expression of a given gene (after removal of background noise and normalization to the housekeeping gene) was used to explore possible correlations between cytokine gene expression and NA content in the hypothalamus. A significant correlation between  $\text{IL-1}\beta$  gene expression and NA content in the hypothalamus was established in the groups of rats that received NaCl, CII, or IFA alone. Interestingly, no such correlation was observed in rats immunized with CII plus IFA (Figure 4B).

#### Depletion of brain NA neurons during arthritis.

Considering the increase in hypothalamic NA content observed in rats during the expression of arthritis, we performed studies to detect possible effects of the depletion of noradrenergic neurons when the disease was manifested. Groups of rats were immunized with CII in IFA and received 6-OHDA or vehicle alone, injected intracerebroventricularly 25 days after immunization, when symptoms of arthritis were observed in all rats. The NA content in the hypothalamus, which was determined at the end of the experiments (day 55), was

depleted by 71% in rats that received 6-OHDA as compared with those that received vehicle alone (Figure 5A). This treatment did not affect the splenic NA concentration (Figure 5A). The same amount of 6-OHDA injected intraperitoneally did not result in a decrease in NA levels in the hypothalamus or in the spleen (data not shown). Despite the effective depletion of NA in the hypothalamus, the clinical arthritis scores in the 6-OHDA-injected rats during the following 30 days of observation did not differ from the scores in rats that received vehicle alone (Figure 5B).

## DISCUSSION

We observed relatively low glucocorticoid levels and hyperactivity of the SNS in the experimental model of CII-induced arthritis in rats, similar to the chronic phase of arthritis in RA patients (8). The changes in hypothalamic cytokine expression and NA concentration detected in parallel indicate that brain-integrated neuroendocrine responses are disorganized during the inflammatory/immune response that causes arthritis, even before symptoms of the disease are detected. The results that support this proposal are as follows.

Blood levels of corticosterone were found to be elevated 5 days after rats were immunized with CII emulsified in IFA, a result that, in our view, is not the consequence of a "classic" acute stress reaction, but

rather, is an endocrine change triggered by the immune response to collagen, as observed following inoculation of other antigens (11,12). However, this increase was not sustained and was followed by a progressive decrease in corticosterone blood levels at a time when high levels of cytokines that can stimulate the HPA axis, such as  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IFN}\gamma$ , are produced during this disease. These results suggest that communication between the HPA axis and the immune system is disturbed.

Our findings contrast with those of other investigators who reported a strong stimulation of the HPA axis in the adjuvant-induced arthritis model (3,27). Differences in the procedure for inducing arthritis and in the strain of rats used may account for this discrepancy. Whereas Harbuz et al used Freund's complete adjuvant to induce the disease, we used type II collagen emulsified in IFA, and we have observed that these adjuvants induce a different pattern of corticosterone response (28). Furthermore, Harbuz et al (27) used the adjuvant-induced arthritis model in PVG rats, which are "resistant" to the induction of several autoimmune diseases, whereas we used DA rats, which are among the strains that are "sensitive" to induction of type II collagen arthritis. A difference in the functioning of the HPA axis is considered to be one of the factors that confer such a distinct sensitivity (29).

The reduced glucocorticoid levels during the chronic phase of CII-induced arthritis correspond well to the decreased activity of the HPA axis that has been reported in patients with rheumatic diseases (30,31). Thus, CII-induced arthritis in DA rats appears to be a suitable model with which to analyze the mechanisms that interfere with the activation of the HPA axis during arthritis, a defect that is not observed during other experimentally induced inflammatory/autoimmune diseases, such as experimental autoimmune encephalomyelitis (28,32,33). Furthermore, it has been shown that the density of noradrenergic nerve fibers is reduced in the inflamed joints of RA patients (34) and in mice with CII-induced arthritis (2), and this finding was confirmed in our studies of the rat model. Sympathetic denervation could be related to local activation of immune cells, since we have reported a similar reduction in the density of noradrenergic fibers in lymphoid organs of mice in which an autoimmune/lymphoproliferative disease develops spontaneously (35).

The HPA axis and the SNS are normally activated in parallel, as reflected by increased circulating concentrations of glucocorticoids and adrenaline. However, in rats immunized with CII plus IFA, the elevation of blood levels of adrenaline during the development of

the disease was by far more prolonged than was activation of the HPA axis. These results suggest that the stress axes are uncoupled in this experimental model of arthritis, as it is in patients with RA (36,37).

The activation of the cytokine–HPA axis circuit is of clinical relevance, since interference with this feedback aggravates experimental and human inflammatory/autoimmune diseases (38,39). Our data indicate that one mediator that might interfere with this circuit in rats with arthritis could be IL-10. The increase in IL-10 production was sustained at relatively late stages of the disease and coincided with enhanced production of  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IFN}\gamma$ . However, the production of IL-1 $\beta$ , the most potent cytokine in terms of its capacity to stimulate glucocorticoid output, was not increased during the overt phase of arthritis. Since it has been shown that IL-1 $\beta$  production in inflamed joints is inhibited by IL-10 (40), it is reasonable to propose that the lack of activation of the HPA axis is due, at least in part, to the capacity of IL-10 to inhibit IL-1 $\beta$  synthesis.

Administration of lipopolysaccharide induces the expression of IL-1 $\beta$  and other proinflammatory cytokines in the hypothalamus and other brain regions (18,19). Moreover, IL-1 $\beta$  has the property to induce the expression of its own gene, and the production of this cytokine in the hypothalamus is relevant, for example, for the stimulation of the HPA axis (41) and the adjustment of glucose homeostasis during acute peripheral stimulation of immune cells (42). Furthermore, brain-borne cytokines are also produced during some types of stress (43), and we have recently reported that IL-1 $\beta$  is expressed along the nociceptive brain pathway in a model of chronic pain (21). However, the possibility that proinflammatory cytokines are induced in the brain during the development of "peripheral" chronic diseases has not previously been explored.

Here we show that the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 are overexpressed in the hypothalamus during the induction phase of CII-induced arthritis. No changes in the expression of these cytokines were noted at later phases of the disease. These data are the first demonstration that overexpression of proinflammatory cytokines in the brain induced from the periphery is detected not only during activation of innate immunity, but also several days following antigenic challenge, when the adaptive specific immune response is manifested. Two main questions remain: first, why does increased IL-1 $\beta$  expression in the hypothalamus not result in sustained stimulation of the HPA axis during the induction phase of the disease, and second, why is expression of proinflammatory cytokines in the

brain not increased during the symptomatic phase, when there is maximal production of immune products in the periphery and no activation of the HPA axis, since both conditions should have favored their expression (44).

Alterations in monoamine concentrations in the hypothalamus were detected during the symptomatic phase. A late increase in serotonin metabolism in the hypothalamus was observed in rats with arthritis, but the most remarkable change in this brain area was a sustained increase in NA concentrations during overt expression of the disease. It has been shown that changes of this magnitude result in activation of the HPA axis (45). However, no increase in blood levels of corticosterone was detected in rats at the time when the hypothalamic NA concentration was increased. These results suggest that, aside from the disturbance in the coupling of the stress axes mentioned above, there are also alterations in the interactions between the central noradrenergic neuron activity and the HPA axis.

The positive correlation between IL-1 $\beta$  gene expression and NA content in the hypothalamus of rats that were used as controls, namely, those that received NaCl, CII, or IFA alone, suggests a causal link between these parameters. This possibility is supported by early evidence showing that IL-1 $\beta$  can stimulate noradrenergic activity in the hypothalamus (25,46). The disappearance of this correlation following immunization with CII plus IFA can be interpreted as evidence that other interactions at central levels, namely, those between neuroendocrine mechanisms and cytokines, are also disrupted during collagen-induced arthritis.

Harbuz et al (27) reported that when 6-OHDA was given centrally before the induction of adjuvant-induced arthritis, inflammation was exacerbated. However, depletion of central NA when the disease was already manifested and the hypothalamic NA concentration was clearly increased (i.e., 25 days after immunization with collagen) did not affect the disease score. This observation might be explained if one considers that sympathetic innervation in the joints is gradually lost as the disease progresses. Indeed, we have previously demonstrated that peripheral ablation of sympathetic fibers abrogates the inhibitory effect that the depletion of brain noradrenergic neurons has on the immune system (47).

In summary, we found that activation of the HPA axis and the SNS is uncoupled during CII-induced arthritis, that noradrenergic innervation in the affected joints markedly decreases during the development of the disease, impeding the transmission of immunoregulatory sympathetic signals, and that neither increased hypothalamic cytokine expression during the induction phase

nor increased hypothalamic NA concentrations during the symptomatic phase results in the expected changes in the activity of the HPA axis. Taken together, these results support the proposal that brain-immune system-joint communication between cytokines conveying afferent signals to the CNS, brain-borne cytokines and neurotransmitters, and 2 main efferent neuroendocrine antiinflammatory pathways becomes progressively disrupted during CII-induced arthritis. Whether such disruption also exists in patients with RA remains to be determined.

## ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge the excellent technical assistance of Gisela Fischer.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Drs. del Rey, Besedovsky, and Straub had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Study design.** del Rey, Besedovsky, Straub.

**Acquisition of data.** del Rey, Wolff, Wildmann, Randolph, Hahnel.

**Analysis and interpretation of data.** del Rey, Wolff, Wildmann, Randolph, Hahnel, Besedovsky, Straub.

**Manuscript preparation.** del Rey, Wolff, Wildmann, Randolph, Hahnel, Besedovsky, Straub.

**Statistical analysis.** del Rey, Besedovsky, Straub.

## REFERENCES

1. Lightman SL, Windle RJ, Ma XM, Harbuz MS, Shanks NM, Julian MD, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal function [review]. *Arch Physiol Biochem* 2002;110:90–3.
2. Harle P, Mobius D, Carr DJ, Scholmerich J, Straub RH. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:1305–13.
3. Harbuz MS, Richards LJ, Chover-Gonzalez AJ, Marti-Sistac O, Jessop DS. Stress in autoimmune disease models [review]. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1069:51–61.
4. Levine JD, Clark R, Devor M, Helms C, Moskowitz MA, Basbaum AI. Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 1984;226:547–9.
5. Lorton D, Lubahn C, Klein N, Schaller J, Bellinger DL. Dual role for noradrenergic innervation of lymphoid tissue and arthritic joints in adjuvant-induced arthritis. *Brain Behav Immun* 1999;13:315–34.
6. Tracey KJ. The inflammatory reflex [review]. *Nature* 2002;420:853–9.
7. Weidler C, Holzer C, Harbuz M, Hofbauer R, Angele P, Scholmerich J, et al. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis* 2005;64:13–20.
8. Bijlsma JW, Cutolo M, Straub RH, Masi AT. Clinical aspects of immune neuroendocrine mechanisms in rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 2005;31:xiii–xvi.
9. Schaible HG, Del Rosso A, Matucci-Cerinic M. Neurogenic aspects of inflammation [review]. *Rheum Dis Clin North Am* 2005;31:77–101, ix.
10. Straub RH, Harle P, Sarzi-Puttini P, Cutolo M. Tumor necrosis factor-neutralizing therapies improve altered hormone axes: an



- alternative mode of antiinflammatory action. *Arthritis Rheum* 2006;54:2039–46.
11. Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses [review]. *Endocr Rev* 1996;17:64–102.
  12. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action [review]. *Physiol Rev* 1999;79:1–71.
  13. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system [review]. *Pharmacol Rev* 2000;52:595–638.
  14. Eskandari F, Webster JI, Sternberg EM. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases [review]. *Arthritis Res Ther* 2003;5:251–65.
  15. Bluthé RM, Michaud B, Kelley KW, Dantzer R. Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. *Neuroreport* 1996;7:2823–7.
  16. Maier SF, Goehler LE, Fleshner M, Watkins LR. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication [review]. *Ann N Y Acad Sci* 1998;840:289–300.
  17. Dantzer R, Konsman JP, Bluthé RM, Kelley KW. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? [review]. *Auton Neurosci* 2000;85:60–5.
  18. Laye S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;27:157–62.
  19. Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J Neurosci Res* 1997;48:287–98.
  20. Trentham DE. Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis [review]. *Arthritis Rheum* 1982;25:911–6.
  21. Apkarian AV, Lavarello S, Randolph A, Berra HH, Chialvo DR, Besedovsky HO, et al. Expression of IL-1 $\beta$  in supraspinal brain regions in rats with neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2006;407:176–81.
  22. Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, et al. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 1998;4:1329–33.
  23. Wang X, Li X, Currie RW, Willette RN, Barone FC, Feuerstein GZ. Application of real-time polymerase chain reaction to quantitate induced expression of interleukin-1 $\beta$  mRNA in ischemic brain tolerance. *J Neurosci Res* 2000;59:238–46.
  24. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995;4:357–62.
  25. Kabiersch A, del Rey A, Honegger CG, Besedovsky HO. Interleukin-1 induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain. *Brain Behav Immun* 1988;2:267–74.
  26. Besedovsky HO, del Rey A, Klusman I, Furukawa H, Monge Arditi G, Kabiersch A. Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40:613–8.
  27. Harbuz MS, Chover-Gonzalez AJ, Biswas S, Lightman SL, Chowdrey HS. Role of central catecholamines in the modulation of corticotrophin-releasing factor mRNA during adjuvant-induced arthritis in the rat. *Br J Rheumatol* 1994;33:205–9.
  28. Del Rey A, Klusman I, Besedovsky HO. Cytokines mediate protective stimulation of glucocorticoid output during autoimmunity: involvement of IL-1. *Am J Physiol* 1998;275:R1146–51.
  29. Wilder RL, Griffiths MM, Cannon GW, Caspi R, Gulko PS, Remmers EF. Genetic factors involved in central nervous system/immune system interaction In: Friedman H, Klein TW, Madden JJ, editors. *Neuroimmune circuits, drugs of abuse and infectious diseases*. New York: Springer; 2001. p. 59–67.
  30. Kanik KS, Wilder RL. Hormonal alterations in rheumatoid arthritis, including the effects of pregnancy [review]. *Rheum Dis Clin North Am* 2000;26:805–23.
  31. Straub RH, Paimela L, Peltomaa R, Scholmerich J, Leirisalo-Repo M. Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to interleukin-6 and tumor necrosis factor in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:654–62.
  32. Levine S, Sowinski R, Steinetz B. Effects of experimental allergic encephalomyelitis on thymus and adrenal: relation to remission and relapse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1980;165:218–24.
  33. MacPhee IA, Antoni FA, Mason DW. Spontaneous recovery of rats from experimental allergic encephalomyelitis is dependent on regulation of the immune system by endogenous adrenal corticosteroids. *J Exp Med* 1989;169:431–45.
  34. Straub RH. Autoimmune disease and innervation. *Brain Behav Immun* 2007;21:528–34.
  35. Del Rey A, Roggero E, Kabiersch A, Schafer M, Besedovsky HO. The role of noradrenergic nerves in the development of the lymphoproliferative disease in Fas-deficient, *lpr/lpr* mice. *J Immunol* 2006;176:7079–86.
  36. Dekkers JC, Geenen R, Godaert GL, Bijlsma JW, van Doornen LJ. Elevated sympathetic nervous system activity in patients with recently diagnosed rheumatoid arthritis with active disease. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:63–70.
  37. Harle P, Straub RH, Wiest R, Mayer A, Scholmerich J, Atzeni F, et al. Increase of sympathetic outflow measured by neuropeptide Y and decrease of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis tone in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: another example of uncoupling of response systems. *Ann Rheum Dis* 2006;65:51–6.
  38. Besedovsky HO, del Rey A. Regulating inflammation by glucocorticoids [letter]. *Nat Immunol* 2006;7:537.
  39. Sternberg EM, Silverman MN, Cizza G. The neuroendocrine system and rheumatoid arthritis: insights from anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  therapy [editorial]. *J Rheumatol* 2007;34:1443–5.
  40. Lubberts E, Joosten LA, Helsen MM, van den Berg WB. Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis: more therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. *Cytokine* 1998;10:361–9.
  41. Dunn AJ. Effects of the IL-1 receptor antagonist on the IL-1- and endotoxin-induced activation of the HPA axis and cerebral biogenic amines in mice. *Neuroimmunomodulation* 2000;7:36–45.
  42. Del Rey A, Roggero E, Randolph A, Mahuad C, McCann S, Rettori V, et al. IL-1 resets glucose homeostasis at central levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:16039–44.
  43. Maier SF, Nguyen KT, Deak T, Milligan ED, Watkins LR. Stress, learned helplessness, and brain interleukin-1 $\beta$  [review]. *Adv Exp Med Biol* 1999;461:235–49.
  44. Goujon E, Parnet P, Laye S, Combe C, Kelley KW, Dantzer R. Stress downregulates lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines in the spleen, pituitary, and brain of mice. *Brain Behav Immun* 1995;9:292–303.
  45. Dunn AJ. Cytokine activation of the HPA axis [review]. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:608–17.
  46. Dunn AJ. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. *Life Sci* 1988;43:429–35.
  47. Pacheco-Lopez G, Niemi MB, Kou W, Bildhauser A, Gross CM, Goebel MU, et al. Central catecholamine depletion inhibits peripheral lymphocyte responsiveness in spleen and blood. *J Neurochem* 2003;86:1024–31.